

**Inhibition der bakteriellen RNA-basierten Ribonuklease P und  
Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Protein-  
basierten Ribonuklease P aus *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Dennis Walczyk, M.Sc.**  
**aus Stadthagen**

Marburg/Lahn 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland K. Hartmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Friedhoff

Eingereicht am 15.08.2016

Tag der mündlichen Prüfung am 26.09.2016

Hochschulkennziffer: 1180

## Zusammenfassung

Die Ribonuklease P (RNase P) ist ein aus verschiedenen Blickwinkeln sehr interessantes Biomolekül, das für die 5'-Maturierung von Vorläufer-tRNAs (Prä-tRNAs) verantwortlich ist. Das bakterielle Enzym ist ein Ribozym, das aus einer RNA- und einer kleinen Protein-Untereinheit besteht, wobei die RNA-Untereinheit der katalytisch aktive Teil ist. Damit unterscheidet sich das bakterielle Enzym architektonisch signifikant von RNase P-Enzymen aus den anderen Domänen des Lebens (Archaea und Eukarya), die einen deutlich erhöhten Proteinanteil besitzen. In höheren Eukaryonten wurden zudem RNase P-Enzyme gefunden, die aus einem singulären Protein bestehen und über keine RNA-Untereinheit mehr verfügen. Im menschlichen Organismus existieren zwei verschiedene RNase P-Enzyme. Die nukleäre RNase P besitzt einen RNA-Anteil und darüber hinaus zehn zusätzliche Proteinuntereinheiten. Die mitochondriale RNase P besteht aus einem ternären Proteinkomplex ohne RNA-Komponente. Diese Strukturunterschiede sowie die essenzielle Funktion der RNase P machen das bakterielle Enzym zu einer interessanten Zielstruktur für die Entwicklung neuer Antibiotika. Da es bisher keine Antibiotika gibt, die primär an die RNase P binden und damit die Bereitstellung maturer tRNAs für die Proteinbiosynthese hemmen, wäre ein solches Antibiotikum vermutlich eine wirksame neue Waffe gegen multiresistente Problemkeime. Im Kontext dieser Arbeit wurden daher verschiedene Strategien zur Inhibition der bakteriellen RNase P evaluiert. Es wurden (i) im Rahmen einer *Antisense*-Strategie hochaffine Oligonukleotide entwickelt, die die RNase P mit einem  $IC_{50}$  im nanomolaren Bereich inhibieren. Dabei wurde vor allem auf LNA-modifizierte Oligonukleotide zurückgegriffen, die aufgrund ihrer Modifikation vor nukleolytischem Abbau geschützt sind und deren Affinität an komplementäre RNA stark erhöht ist. Auf Basis (ii) bioinformatischer Vorhersagen entwickelte heterozyklische Verbindungen sollten die RNase P durch Bindung in die zentrale Furche der Proteinuntereinheit hemmen. Diese Furche interagiert mit den 5'-*Leader*-Sequenzen von Prä-tRNA-Substraten. Allerdings konnte hier keine effiziente Inhibition der RNase P-Reaktion erreicht werden, was auf die geringe Löslichkeit der Verbindungen zurückführbar ist. Die von unserem Kooperationspartner (AG W. Diederich) synthetisierten Hydrochlorid-Derivate der gleichen Verbindungsklasse führten hier ebenfalls nicht zum Erfolg, da sie entweder durch eine Azidifizierung der Spaltansätze die pH-abhängige RNase P-Reaktion hemmten oder bei Einstellung eines neutralen pH-Werts ihre Löslichkeit verloren. Bei der Verwendung (iii) neuartiger Aminoglykoside, die mit Guanidinium-Gruppen derivatisiert waren, konnte dagegen eine deutliche Inhibition

beobachtet werden ( $IC_{50}$  im mikromolaren Bereich). Allerdings stellte sich heraus, dass die Inhibition durch Bindung sowohl an die P RNA als auch an das Substrat zustande kam und damit als relativ unspezifisch eingeordnet werden muss. Schließlich wurde (iv) in einem automatisierten bakteriologischen Testansatz (*high throughput screening*) der Versuch unternommen, inhibitorische Kleinmoleküle in einer Substanzbibliothek zu identifizieren. Dazu wurde der Komplementationsstamm *E. coli* BW verwendet, der es erlaubte, durch ein kombiniertes *Screening* und *Counterscreening* zwischen einer für die bakterielle RNase P spezifischen und einer unspezifischen Hemmung zu diskriminieren. Mit diesem Ansatz konnte jedoch keine Verbindung identifiziert werden, die spezifisch die bakterielle RNase P inhibiert, wobei die Größe der Substanzbibliothek (ca. 40,000 Verbindungen) die Erfolgsaussichten sicherlich von vornherein limitierte.

Der für die RNase P beobachtete evolutionäre Trend weg von einer autonomen katalytischen RNA hin zu einem erhöhten Proteinanteil des Enzyms, verknüpft mit einem Verlust der RNA-allein-Aktivität, ist vor allem aus evolutionsbiologischer Sicht sehr interessant. Letztlich ist dieser Trend sehr gut mit der RNA-Welt-Hypothese vereinbar, nach der die meisten Funktionen primordialer Zellen zunächst von Nukleinsäuren (möglicherweise in Kombination mit kleinen peptidartigen Molekülen) ausgeführt und später nach und nach von Proteinen übernommen wurden. Das Enzym *Proteinaceous RNase P* (PRORP) aus *Arabidopsis thaliana* besteht aus einem einzelnen Protein und illustriert ebenfalls die Entwicklung hin zur heutigen Protein-dominierten Biologie. Im Rahmen dieser Arbeit stand die Frage im Vordergrund, inwieweit sich die RNA-basierten und rein Protein-basierten RNase P-Enzyme mechanistisch unterscheiden. Zur Klärung kinetischer und mechanistischer Unterschiede bei der tRNA-Prozessierung wurden vergleichende Studien basierend auf den bereits im bakteriellen System etablierten kinetischen Ansätzen durchgeführt. Dafür wurden Prä-tRNAs mit singulären Modifikationen an der Spaltstelle (Phosphorothioate und 2'-Ribose-Modifikationen) als Substrate verwendet. Hier kristallisierte sich vor allem eine im Vergleich zur bakteriellen RNase P inverse Substratanordnung im aktiven Zentrum heraus: während bei PRORP-Enzymen sehr wahrscheinlich zwei Metallionen mit dem pro-Sp-Sauerstoff des zu spaltenden Phosphodiesters im Übergangszustand wechselwirken, so findet eine vergleichbare Interaktion bei RNA-basierten Enzymen mit dem pro-Rp-Sauerstoff statt. Aufgrund der Ausweichspaltung im Fall einiger 2'-modifizierter Substrate in Reaktionen mit beiden RNase P-Enzymarten kann der Schluss gezogen werden, dass in beiden Systemen die 2'-OH-Gruppe an der Spaltstelle in einen wichtigen Kontakt mit dem Enzym involviert ist. Wahrscheinlich

handelt es sich um eine Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion der 2'-OH-Gruppe. Ein interessantes Ergebnis war weiterhin, dass die Ausweichspaltung in Gegenwart bestimmter 2'-Modifikationen (z.B. 2'-OCH<sub>3</sub>) an der kanonischen Spaltstelle im Fall der PRORP-katalysierten Reaktion kinetisch deutlich effizienter war als in Reaktionen der bakteriellen RNase P. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass kanonische und Ausweichspaltung in der PRORP-katalysierten Reaktion voneinander unabhängiger sind als in der RNA-basierten Reaktion, d.h. die *cleavage fidelity* scheint bei PRORP-Enzymen relaxiert zu sein. Diese Interpretation steht mit den Erkenntnissen aus einer anderen Studie in Einklang, nach der PRORP-Enzyme weniger als bakterielle RNA-basierte Enzyme auf Erkennungsdeterminanten im Bereich der Spaltstelle zurückgreifen, sondern primär die globale Struktur des Akzeptorstamm/T-Arm-Moduls von tRNAs erkennen.

## Abstract

Bacterial Ribonuclease P (RNase P), which is responsible for the 5'-maturation of precursor tRNAs (pre-tRNA), appears as a very interesting biomolecule. It is a ribozyme that consists of a catalytic RNA and a small auxiliary protein subunit. Moreover, bacterial RNase P differs substantially from RNase P enzymes of the two other domains of life, Archaea and Eukarya, which have recruited multiple protein components during evolution with a concomitant loss of robust RNA-alone activity. In addition, RNase P enzymes that are singular proteins lacking any RNA component have been identified in four of the five eukaryal supergroups. In human, two different RNase P enzymes coexist. The nuclear RNase P contains an RNA component and ten protein subunits, while the mitochondrial RNase P consists of a ternary protein complex devoid of any RNA component. These architectural differences combined with the fact that bacterial RNase P is indispensable for cell survival make the bacterial enzyme a promising target for the development of novel antibiotics. Since no antibiotics are yet known that bind to RNase P as the primary target, inhibitors of bacterial RNase P would open up novel perspectives to combat multiresistant bacterial pathogens.

Different strategies for the inhibition of bacterial RNase P were explored in the presented thesis work. By pursuing an (i) antisense strategy, highly affine oligonucleotides were developed that are able to inhibit bacterial RNase P with a nanomolar  $IC_{50}$ . As antisense molecules, LNA-modified oligonucleotides were used which enhance protection against nucleolytic degradation and confer increased affinity for complementary RNAs. (ii) Bioinformatic analyses predicted heterocyclic compounds that bind to the bacterial RNase P protein (P protein) and sterically block binding of the pre-tRNA 5'-leader. However, despite the synthesis of several compound derivatives by our cooperation partner (AG W. Diederich), no substantial inhibition of bacterial RNase P activity could be obtained. This was attributable to low compound solubility, and hydrochloride derivatives either acidified reaction assays (thereby negatively affecting the pH-dependent RNase P cleavage reaction) or became largely insoluble upon adjusting the pH conditions to neutral. A significant inhibition (micromolar  $IC_{50}$ ) could be observed using (iii) novel, guanidinium-derivatized aminoglycosides as inhibitors. The analysis revealed that inhibition included contributions from binding to P RNA as well as to pre-tRNA. Finally, an approach was pursued to (iv) identify inhibitors in a compound library by high throughput screening. For this purpose, the complementation strain *E. coli* BW (either expressing endogenous or PRORP RNase P) was used, which enabled us to perform an automatic screening and counterscreening with the goal to discriminate between

specific (with respect to *E. coli* RNase P) and unspecific inhibition. However, no compound specifically acting on bacterial RNase P could be identified. Here, the size of the compound library (~ 40,000 compounds) was certainly a limiting factor of success prospect.

The observed evolutionary appearance of RNase P, ranging from an almost RNA-alone activity in Bacteria towards the recruitment of additional protein components in Archaea and Eukarya and culminating in single protein RNase P (PRORP), is intriguing in terms of evolutionary biology. Basically, this trend can be considered as an indirect proof of the hypothesis of a former RNA world, according to which the function of primordial cells were carried out by nucleic acids (possibly with the help of small peptide-like molecules) in an intermediate period of evolution, after which most of these functions were taken over by proteins. Above this background, a comparison of the different catalytic strategies utilized by RNA-based and protein-only RNase P for the task of tRNA maturation is interesting, considering that the reaction mechanism of the bacterial RNase P is well described. For this reason, approaches established for the study of catalysis by bacterial RNase P were applied to protein-only RNase P. For the evaluation of kinetic and mechanistic differences between the two types of RNase P, pre-tRNAs with single-site modifications at the cleavage site (phosphorothioates and 2'-ribose modifications) were used as substrates. This revealed an inverse configuration of the scissile phosphodiester in the active site of *Arabidopsis thaliana* PRORP3 (*At*PRORP3): while two metal ions interact with the pro-*Sp* oxygen in the PRORP-catalyzed reaction, a comparable interaction occurs with the pro-*Rp* oxygen in reactions catalyzed by RNA-based RNase P enzymes. The shift of cleavage site to the next (in 5' direction) unmodified phosphodiester caused by several 2'-modifications at the canonical cleavage site (nt -1/+1) in reactions of both types of RNase P suggests a key role for this ribose 2'-OH substituent in the catalytic strategies utilized by RNA-based and protein-only RNase P, with evidence for an H bond acceptor function of the 2'-OH group in both cases. Another outcome of this study was the finding that miscleavage induced by several 2'-modifications at nt -1 (such as 2'-OCH<sub>3</sub>) was more efficient in reactions catalyzed by PRORP than RNA-based bacterial RNase P. We drew the conclusion that canonical and miscleavage pathways are less interdependent in reactions by PRORP, consistent with the notion that PRORP enzymes act with reduced cleavage fidelity relative to bacterial RNase P. This interpretation is in line with another study indicating that PRORP depends on fewer recognition determinants at the cleavage site, but primarily recognizes the shape of the acceptor stem/T arm module of tRNAs.

## Inhalt

1 Einleitung .....	1
1.1 Die Ribonuklease P .....	1
1.1.1 Aufbau und Struktur der bakteriellen RNase P .....	3
1.1.2 Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P .....	4
1.1.3 Inhibitionsmöglichkeiten der bakteriellen RNase P .....	6
1.2 Nukleinsäuremodifikationen .....	7
1.2.1 Phosphat-Modifikationen .....	8
1.2.2 Ribose-Modifikationen.....	9
1.3 Aufgabenstellung .....	9
1.3.1 Strategien zur Inhibition der RNase P aus <i>B. subtilis</i> .....	9
1.3.2 Ein Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung von RNase P-Inhibitoren .....	10
1.3.3 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus <i>A. thaliana</i> .....	11
2 Material und Methoden .....	13
2.1 Material .....	13
2.1.1 Geräte .....	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.3 Chemikalien und Enzyme .....	14
2.1.4 Nukleinsäuren und Oligonukleotide.....	16
2.1.5 Plasmide und Bakterienstämme .....	18
2.1.6 Puffer und Lösungen .....	19
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Proteinbiochemische Methoden .....	20
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.3 Ribozymkinetische Untersuchungen .....	33
2.2.4 Mikrobiologische Methoden .....	38
3 Ergebnisse und Diskussion.....	41

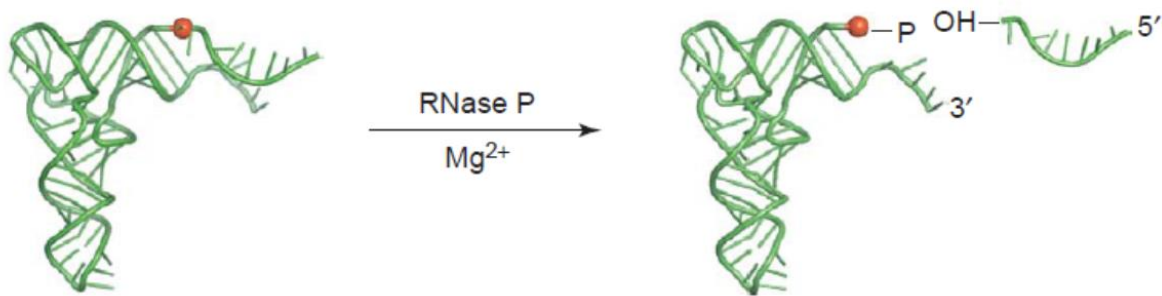


3.1 Strategien zur Inhibition der RNase P aus <i>B. subtilis</i> .....	41
3.1.1 <i>Antisense</i> -Oligonukleotide .....	41
3.1.2 Aminoglykoside .....	83
3.1.3 Heterozyklen .....	89
3.2 Ein Hochdurchsatz <i>screening</i> zur Identifizierung von RNase P-Inhibitoren .....	96
3.2.1 Pilotexperimente und Minituarisierung .....	96
3.2.2 Bedeutung des Z'-Faktors .....	98
3.2.3 Optimierung .....	98
3.2.4 Assaytransfer und Endpunkt-Messung.....	99
3.2.5 Primär- <i>Screen</i> .....	100
3.2.6 Validierungs- <i>Screen</i> .....	101
3.2.7 Diskussion .....	102
3.3 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus <i>A. thaliana</i> .....	104
4 Ausblick .....	128
4.1 Beiträge zur Inhibition der bakteriellen RNase P .....	128
4.2 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus <i>A. thaliana</i> .....	130
5 Literatur .....	131
Anhang .....	136

# 1 Einleitung

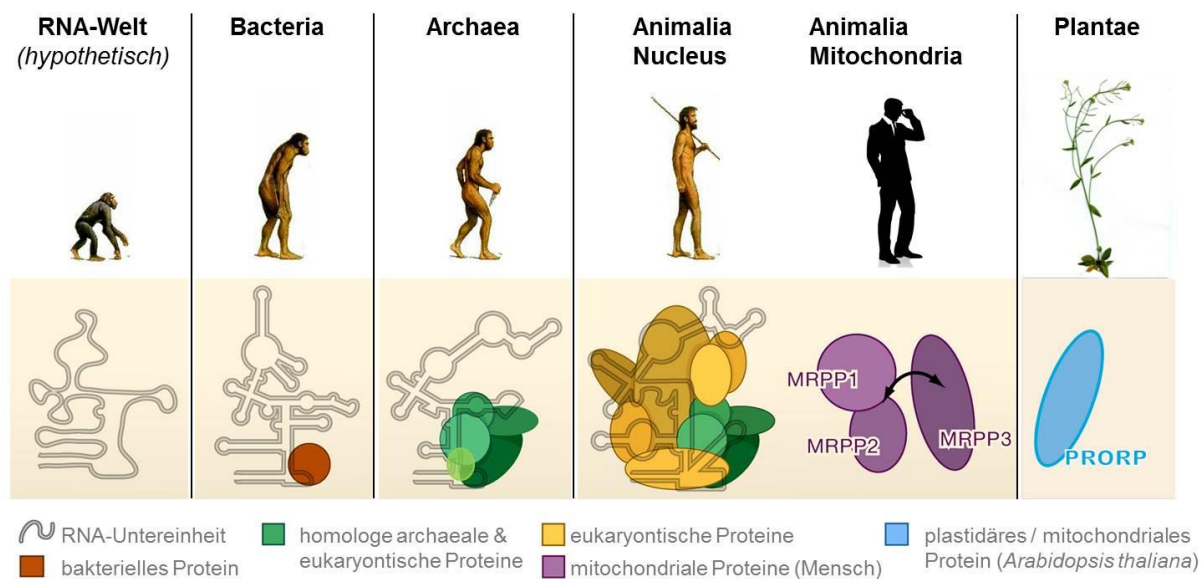
## 1.1 Die Ribonuklease P

Die Hauptfunktion der Ribonuklease P (RNase P) ist die 5'-Maturierung von Vorläufer-tRNAs (*precursor tRNA*; Prä-tRNA; Abbildung 1), um funktionale tRNAs zu erhalten.<sup>1</sup> Sie besteht in Bakterien aus einer RNA (~400 nt, sog. P RNA) und einer kleinen Proteinuntereinheit (~13 kDa, sog. P Protein). Bereits 1983 konnte gezeigt werden, dass die RNA-Untereinheit die katalytisch aktive Komponente des Enzyms ist.<sup>2</sup> Es handelt sich also um ein Ribozym (Nobelpreis S. Altman und T.R. Cech 1989 für die Entdeckung der katalytischen Eigenschaften von RNA), das endonukleolytisch und Magnesium-abhängig RNA spaltet und in allen Domänen des Lebens vorkommt.<sup>3,4</sup>



**Abbildung 1:** Modell der 5'-tRNA-Maturierung. Aus einer *precursor tRNA* (Prä-tRNA) entsteht durch RNase P-Katalyse (mit dem Kofaktor  $Mg^{2+}$ ) die reife tRNA (mit einem 5'-Phosphatrest) und der 5'-Vorläufer (mit einem 3'-OH-Rest). Abbildung adaptiert nach Evans et al.<sup>3</sup>

Man geht davon aus, dass in einer hypothetischen RNA-Welt die RNase P lediglich aus RNA bestand, welche die RNase P-Reaktion katalysiert hat.<sup>5</sup> Im Laufe der Evolution wurde dann für die bakterielle RNase P eine kleine Proteinuntereinheit dazu rekrutiert, um die Spezifität und Reaktivität zu erhöhen (Abbildung 2). Im Vergleich zum bakteriellen Enzym hat die archaeale RNA fünf grundsätzlich verschiedene Proteine erworben. Vier davon wurden bis hin zur eukaryontischen RNase P beibehalten und zusätzlich wurden weitere 5-6 Proteine dazu gewonnen.<sup>6</sup> Schließlich konnte in menschlichen Mitochondrien ein ternäres Enzym (MRPP1-3) identifiziert werden, das ausschließlich aus Proteinen besteht und in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* ein singuläres Enzym (*proteinaceous RNase P*, sog. PRORP), das ein Homolog zu MRPP3 darstellt.<sup>7,8</sup>



**Abbildung 2:** Ausgehend von einer hypothetischen RNA-Welt entwickelten Bacteria und Archaea divergente Lösungen zur Katalyse der RNase P-Reaktion. Ausgehend von der archaealen RNase P entwickelte sich wahrscheinlich die Kern-lokalisierte humane RNase P. Später wurden sogar rein proteinbasierte Enzyme entdeckt. Abbildung aus Walker & Engelke bzw. Walczyk & Hartmann.<sup>6,9</sup>

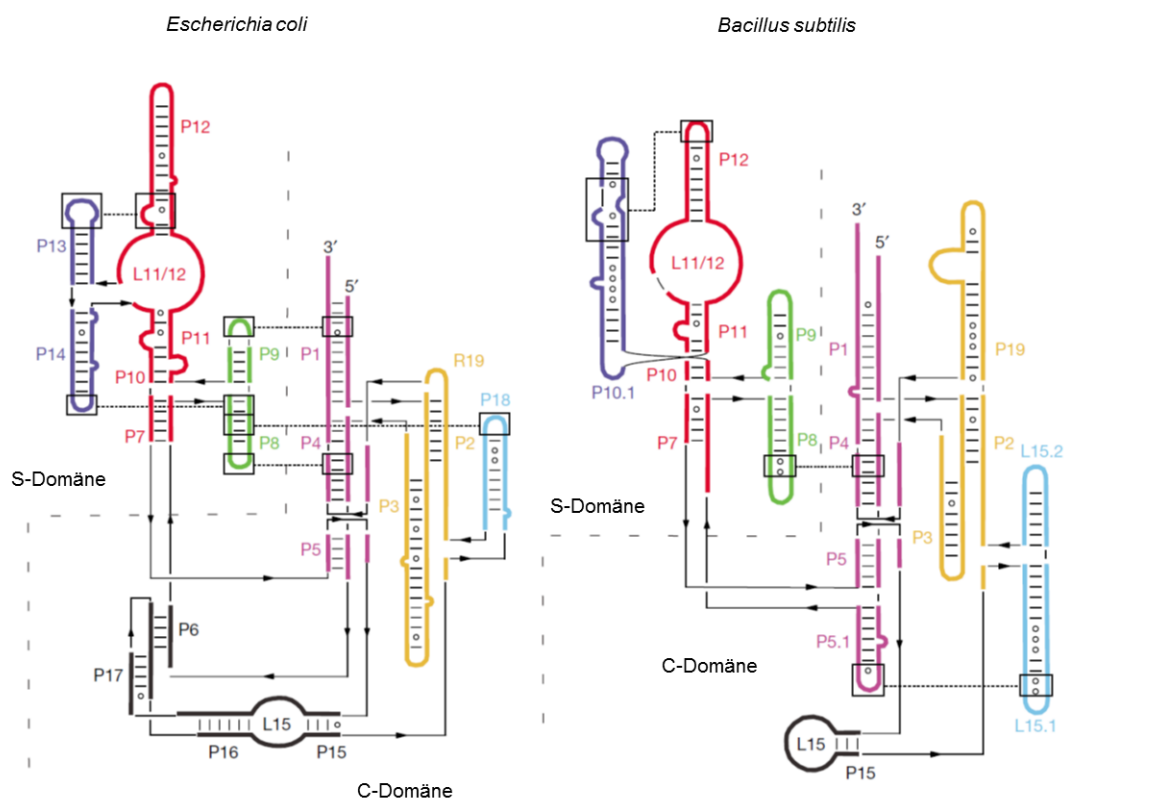
Die ubiquitäre RNase P-Reaktion ist für das Überleben von Zellen und Organismen unabdingbar. Im Fall einer defekten 5'-Maturierung wären keine funktionalen tRNAs verfügbar und letztendlich könnte keine Proteinbiosynthese stattfinden. Folglich verwundert es nicht, dass das Gen *mpb* des Bodenbakteriums *Bacillus subtilis*, das für die RNA-Komponente der RNase P kodiert, zu den wenigen Genen gehört, die als essentiell beschrieben wurden.<sup>10</sup>

Interessanterweise wurde gezeigt, dass sich die beiden bakteriellen RNase P RNAs aus *E. coli* und *B. subtilis* *in vivo*, trotz struktureller und biophysikalischer Unterschiede, wechselseitig funktional ersetzen können (als Komplementation bezeichnet).<sup>11</sup> Darüber hinaus ist sogar eine Komplementation zwischen Organismen verschiedener Domänen des Lebens möglich. Zum Beispiel konnte die endogene RNase P aus *E. coli* durch die RNase P aus *A. thaliana* ersetzt werden.<sup>8</sup>

Dennoch bestehen zwischen den bakteriellen und eukaryontischen RNase Ps substantielle strukturelle Unterschiede. Zusammen mit der Tatsache, dass es sich um eine für das bakterielle Überleben unverzichtbare Reaktion handelt, bietet dieser Sachverhalt einen potentiellen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika. Allerdings sind bisher keine Antibiotika bekannt, die die RNase P-abhängige Prä-tRNA-Prozessierung adressieren.

### 1.1.1 Aufbau und Struktur der bakteriellen RNase P

In Bakterien besteht die RNase P aus einer RNA- und einer Protein-Komponente. Man unterscheidet dabei den Typ A (*ancestral type*, liegt z.B. in *E. coli* vor) und den Typ B (*Bacillus type*), wobei sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene Unterschiede vorliegen.<sup>12</sup> Nichtsdestotrotz existieren in der RNA-Untereinheit bakterieller RNase Ps fünf konservierte Bereiche (*conserved region*, CR I-V). Die P RNA besteht aus 350-400 Nukleotiden (nt), die in zwei Domänen organisiert sind, der S- und C-Domäne. Die S-Domäne (*specificity domain*) interagiert mit dem T-Arm der Prä-tRNA und dient somit als Vermittler einer Spezifität für tRNAs. Die C-Domäne (*catalytic domain*) beinhaltet das aktive Zentrum der RNA und bildet zudem die Kontaktfläche für das P Protein. Interessanterweise falten sich die beiden Domänen unabhängig voneinander.<sup>1,3,12</sup>



**Abbildung 3:** Sekundärstruktur der P RNA von *E. coli* (A-Typ) und *B. subtilis* (B-Typ). Abbildung adaptiert nach Wegscheid et al.<sup>11,13</sup>

Das RNase P Protein (~14 kDa) ist *in vitro* für die Katalyse nicht essentiell, wird aber *in vivo* zwingend für die Funktion benötigt. Es handelt sich dabei um ein kleines basisches Protein, das im Bereich der Helices P2-P3-P4 (Abbildung 3) an die P RNA bindet. Es bindet während der RNase P-Reaktion die 5'-Flanke der Prä-tRNA. Das P Protein hat vielfältige Rollen: es

stabilisiert die aktive Konformation der P RNA, vermittelt eine affinere Bindung katalytisch relevanter Magnesiumionen, trägt zur Diskriminierung zwischen Produkt und Substrat bei und vermittelt die Dimerisierung des Holoenzym.<sup>1,3,14-20</sup>

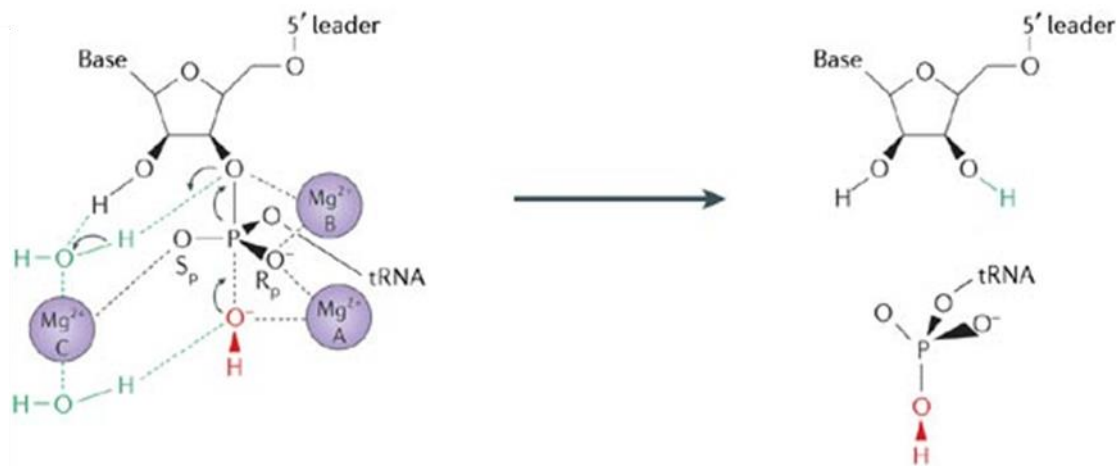
Die korrekte Faltung des Proteins erfordert die Anwesenheit von (Poly-)Anionen, natürlicherweise in Form der P RNA.<sup>21,22</sup> Das Protein bildet ein  $\alpha$ - $\beta$ -sandwich mit den Abmessungen 40×35×30 Å. Es bestehen dabei große topologische Gemeinsamkeiten mit dem ribosomalen Protein S5 und dem Elongationsfaktor EF-G.<sup>23</sup> Interessanterweise konnte im Rahmen von *high throughput*-Kinetiken eine Spezifität des P Proteins für bestimmte RNA-Sequenzen gefunden werden.<sup>24</sup>

Bereits 2008 wurde ein Enzym gefunden, das eine RNase P-Aktivität jedoch keine RNA-Untereinheit besitzt. Es handelt sich dabei um die humane mitochondriale RNase P (*mitochondrial RNase P Protein*, MRPP1-3), ein Komplex aus drei verschiedenen Proteinen.<sup>7</sup> Schließlich gelang in dem Modellorganismus *A. thaliana* der Nachweis eines singulären RNase P-Proteins, das als *proteinaceous RNase P* (PRORP) bezeichnet wurde.<sup>8</sup> Es ist aus drei Domänen aufgebaut: einer *Pentatricorepeat*-Domäne (PPR), einer zentralen Domäne und einer Metallonuklease-Domäne. Die PPR-Domäne vermittelt die Substrataffinität und ist über die zentrale Domäne mit der Metallonuklease-Domäne verbunden, die das katalytische Zentrum besitzt.<sup>25</sup>

### 1.1.2 Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P

Es handelt sich bei der RNase P-Reaktion um eine endonukleolytische Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung, wobei ein 5'-Phosphat am Ende der prozessierten tRNA und ein 2'-3'-*cis*-Glycol am Ende des 5'-Vorläufers entsteht.<sup>12</sup> Die Reaktion ist stark vom Vorhandensein ein- und zweiwertiger Kationen abhängig.<sup>26</sup> Für die eigentliche Katalyse ist vor allem  $Mg^{2+}$  von Bedeutung. Die Reaktion verläuft sehr wahrscheinlich nach einem Zwei-Metallionen-Mechanismus, der für komplexere katalytische RNAs sowie nukleolytische Proteinenzyme postuliert wurde.<sup>4</sup> Die zu spaltende Bindung wird von  $Mg^{2+}$ -Ionen umlagert und bildet einen trigonal-bipyramidalen Übergangszustand aus. Dabei agiert ein aktiviertes Wasser-Molekül (Hydroxid-Ion) als Nukleophil, das das Phosphoratom angreift. Bedingt durch die Art des Nukleophils ist die Reaktion stark pH-abhängig. Die Reaktionsgeschwindigkeit beträgt bei pH 6  $\sim 2 \text{ min}^{-1}$  und bei pH 8  $\sim 5 \text{ s}^{-1}$ .<sup>12,27</sup> Es gibt Hinweise

auf konformative Änderungen im aktiven Zentrum der P RNA nach Bindung der Prä-tRNA, die insbesondere die Positionierung der essentiellen  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen betrifft (Abbildung 4).<sup>28</sup>



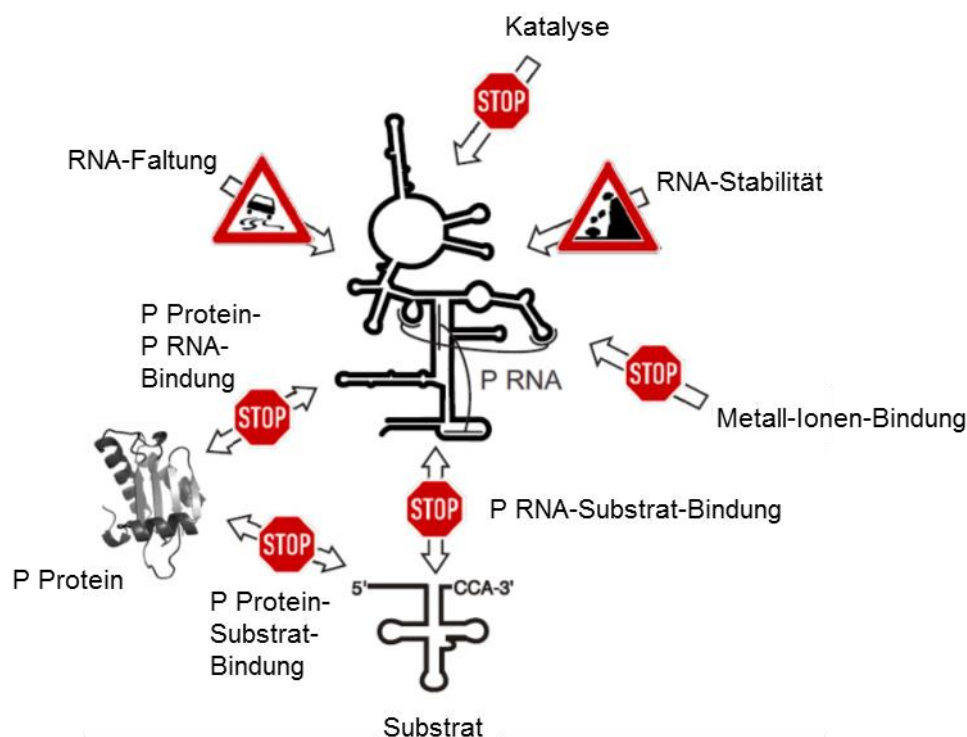
**Abbildung 4:** Modell des Reaktionsmechanismus der endonukleolytischen Hydrolyse einer Prä-tRNA durch RNase P. Als Nukleophil agiert ein Hydroxidion, das im Rahmen einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion am Phosphoratom angreift. Der 3'-Ribose-Sauerstoff der 5'-Vorläufers (5'-leader) fungiert als Abgangsgruppe. Stabilisiert durch zwei  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen bildet sich ein trigonal-bipyramidaler Übergangszustand aus. Ein drittes  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion könnte die Ausbildung eines unterstützenden Wasserstoffbrücken-Netzwerks bewirken. Abbildung adaptiert nach Kazantsev & Pace.<sup>12</sup>

Ist kein P Protein vorhanden, so lässt sich *in vitro* die Reaktionsfähigkeit der P RNA durch eine stark erhöhte  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration (100 mM) wiederherstellen. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem der pro- $R_p$ -Sauerstoff für die Katalyse relevant ist, da er zwei  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen koordiniert. Tauscht man ihn im Rahmen einer Phosphorothioat-Modifikation gegen Schwefel aus, wird die Reaktion stark inhibiert. Durch Verwendung des thiophileren  $\text{Cd}^{2+}$  anstelle von  $\text{Mg}^{2+}$  lässt sich die Reaktionsfähigkeit aber wiederherstellen (*Rescue-Effekt*).<sup>29,30</sup>

Die Substraterkennung zwischen RNase P und Prä-tRNA wird durch verschiedene Partialinteraktionen vermittelt. Ein wichtiger Aspekt ist die essentielle Interaktion zwischen der 5'-Flanke der Prä-tRNA und dem P Protein. Auf RNA-Ebene ist die Wechselwirkung zwischen dem T-Arm der tRNA und der S-Domäne der P RNA hervorzuheben. Eine weitere Schlüsselrolle spielt die Interaktion zwischen dem 3'-CCA-Ende der Prä-tRNA sowie dem Diskriminator-Nukleotid +73 und dem P15/L15-Bereich der P RNA. Dabei bilden die beiden Cytosin-Reste des CCA-Endes Watson-Crick-Basenpaarungen mit zwei Guanosen in der L15-Schleife aus.<sup>1</sup>

### 1.1.3 Inhibitionsmöglichkeiten der bakteriellen RNase P

Da es sich bei der bakteriellen RNase P um ein Ribozym handelt, gibt es verschiedenste Möglichkeiten der Inhibition der RNase P. So kann beispielsweise die Ribozym:Substrat-Wechselwirkung sowohl über die RNA:Substrat- als auch über die Protein:Substrat-Interaktion gestört werden. Denkbar ist auch eine Störung der RNA-Faltung oder der Metall-Ionen-Bindung. Einige der in Abbildung 5 skizzierten Inhibitionsoptionen wurden bereits untersucht.



**Abbildung 5:** Übersicht über die verschiedenen Inhibitionsmöglichkeiten einer bakteriellen RNase P. Im Vergleich zu monomeren Proteinenzymen steht hier eine Vielzahl weiterer Inhibitionsmöglichkeiten zur Verfügung. Abbildung adaptiert nach Willkomm et al.<sup>31</sup>

Eine effiziente Inhibition der RNase P aus *E. coli* konnte durch eine *Antisense*-Strategie erreicht werden. Dabei wurde die RNase P RNA:Substrat-Interaktion im Bereich der L15-Schleife der P RNA durch ein komplementäres Oligonukleotid blockiert. Auf diese Weise ließ sich im Rahmen von *in vitro* Experimenten ein  $IC_{50}$ -Wert im nanomolaren Bereich erreichen.<sup>32,33</sup> Auch *in vivo* war es möglich, unter Verwendung eines sequenzidentischen PNA-Oligonukleotids, gekoppelt an ein invasives Peptid, eine RNase P-spezifische Wachstumshemmung von *E. coli*-Zellen zu bewirken.<sup>34</sup>

Um die RNase P RNA in einer nicht funktionalen Struktur zu fixieren, wurde ein 2'-modifiziertes 12-mer verwendet, welches komplementär zu den Nukleotiden 289-300 der P RNA aus *E. coli* war. Hier konnte im Rahmen kotranskriptionaler Inhibitionsexperimente ein IC<sub>50</sub>-Wert von ca. 200 nM erreicht werden.<sup>35</sup>

IC<sub>50</sub>-Werte im unteren mikromolaren Bereich konnten in einem alternativen Ansatz erreicht werden, bei dem kleine organische Verbindungen verwendet wurden. Die identifizierten Benzimidazol-Derivate interagierten mit dem tRNA-Substrat, so dass es nicht mehr für eine RNase P-Reaktion zur Verfügung stand.<sup>36</sup> Inhibitorische Effekte der RNase P-Reaktion im millimolaren Bereich wurde für die Moleküle Calcipotriol und Anthralin berichtet.<sup>37</sup>

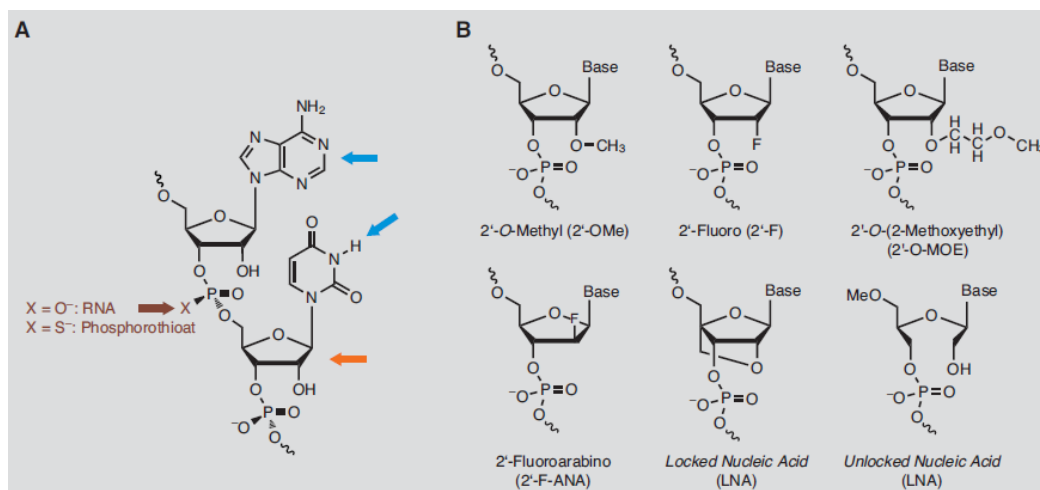
Insbesondere Aminoglykosid-Konjugate wurden in den vergangenen Jahren verstärkt untersucht. Dabei kristallisierte sich als Wirkungsmechanismus eine elektrostatische Interferenz der protonierten Aminogruppen der Aminoglykoside mit der Bindung essentieller Mg<sup>2+</sup>-Ionen heraus (wobei hier eine Interaktion mit der P RNA und der Substrat-RNA stattzufinden scheint). Die gemessenen IC<sub>50</sub>-Werte lagen dabei im niedrigen mikromolaren Bereich.<sup>38-40</sup>

Im Bereich der Wirkstoffforschung konnten gerade in den letzten Jahren aufgrund instrumenteller Fortschritte Erfolge durch den Einsatz von Hochdurchsatzverfahren (*high throughput screening*, HTS) erzielt werden. Dabei wird parallel eine Substanzbibliothek auf mögliche Inhibitionseffekte getestet. Durch Einsatz eines innovativen Aktivitätsassays gelang solch ein HTS unter Verwendung der RNase P aus *B. subtilis*. Dabei wurde das Naturstoffderivat Iridinol-Hexaacetat (ein Vertreter der Isoflavone) als möglicher RNase P-Inhibitor identifiziert.<sup>41</sup>

## 1.2 Nukleinsäuremodifikationen

Modifikationen an Oligonukleotiden sind generell an drei verschiedenen Positionen denkbar: Nukleobase, Phosphat oder Ribose (Abbildung 6).<sup>42,43</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Phosphat- (Phosphorothioat) und Ribosemodifikationen (2'-O-Methyl, 2'-Fluoro, 2'-Amino und *Locked Nucleic Acid*) verwendet, daher werden Nukleobasenmodifikationen im Folgenden außer Acht gelassen.





**Abbildung 6:** Übersicht über verschiedene Modifikationen für Nukleinsäuren. Nukleobasenmodifikationen sind mit blauen Pfeilen, Phosphatmodifikationen mit braunen Pfeilen und Ribosemodifikationen mit orangenen Pfeilen markiert. Abbildung aus Grünweller & Hartmann.<sup>42</sup>

Nukleinsäuremodifikationen können aus verschiedenen Gründen eingeführt werden. Einerseits lassen sich durch geschickt platzierte Modifikationen die pharmakologischen Eigenschaften von Nukleinsäuretherapeutika verbessern, andererseits erhöhen bestimmte 2'-Ribosemodifikationen die Affinität zum komplementären Zielmolekül. Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende singuläre Modifikationen in die RNase P-Spaltstelle der Prä-tRNA eingeführt, um mechanistische Erkenntnisse zur Katalyse proteinbasierter RNase P-Enzyme zu gewinnen.

### 1.2.1 Phosphat-Modifikationen

Prominente Phosphat-Modifikationen sind Phosphorothioate, bei denen ein (Nichtbrücken-) Sauerstoff der Phosphodiesterbindung durch ein Schwefel-Atom substituiert ist.<sup>42</sup> Zwar bewirkt diese Modifikation eine etwas geringere Affinität zu einem komplementären Nukleinsäure-Zielmolekül, andererseits lässt sie sich sehr gut für mechanistische Studien nutzen (z.B. im Kontext der Prä-tRNA-5'-Prozessierung, siehe 1.1.2 Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P).<sup>29,44</sup> Für mechanistische Studien ist insbesondere die Orientierung des Schwefelatoms und insofern eine enantiomerenreine Auftrennung nach der Synthese von Bedeutung. Über eine entsprechende HPLC-Aufreinigung ist eine Diskriminierung zwischen *R*- und *S*-Konformation problemlos möglich. Eine Phosphorothioatmodifikation ist nicht mit einer Phosphorothiolatmodifikation zu verwechseln (dabei ist der 3'-Sauerstoff der Ribose durch ein Schwefelatom ausgetauscht).

### 1.2.2 Ribose-Modifikationen

Unter den Ribose-Modifikationen sind die sog. *Locked Nucleic Acids* (LNA) aufgrund ihrer herausragenden Eigenschaften hervorzuheben. Dabei ist der 2'-Sauerstoff über eine Methylenbrücke mit dem 4'-Kohlenstoff verbunden.<sup>42</sup> Dies fixiert den Zucker in der C3'-*endo*-Position, also in jener Konformation, die auch in A-Helices populiert wird, was zum einen die Rigidität LNA-haltiger Nukleinsäuren mit DNA oder RNA erhöht und zum anderen die entropische „Strafe“ bei der Helixbildung reduziert, infolgedessen LNA-haltige Duplexe stark erhöhte T<sub>m</sub>-Werte besitzen.<sup>43</sup> Es ist ohne weiteres möglich, LNA-Bausteine nur vereinzelt an bestimmten Positionen in ein Oligonukleotid einzuführen und damit sog. Mixmere zu synthetisieren. Auf diese Weise kann man ein Oligonukleotid, das z.B. als sterischer Inhibitor eingesetzt werden soll, im Hinblick auf seine Affinität, aber auch bezüglich anderer Eigenschaften wie der Vermeidung möglicher Sekundärstrukturen oder der Minimierung einer Dimerisierung optimieren und modulieren.

Auch andere 2'-Modifikationen begünstigen die C3'-*endo*-Konformation, allerdings in einem geringeren Ausmaß als LNA-Modifikationen, was ebenfalls die Affinität zu komplementären Nukleinsäuren leicht erhöht. Dazu zählen vor allem 2'-O-Methyl-(2'-O-Me) und 2'-Fluoro-(2'-F) Modifikationen. Vom pharmakologischen Standpunkt bedeutsam ist auch, dass die genannten Substituenten aufgrund der räumlichen Nähe zum 3'-Phosphat eine große Stabilität gegenüber Nukleasen vermitteln.<sup>45</sup>

## 1.3 Aufgabenstellung

### 1.3.1 Strategien zur Inhibition der RNase P aus *B. subtilis*

Wie bereits einleitend erwähnt stehen aufgrund des Ribozymcharakters der bakteriellen RNase P verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, dieses essentielle Ribozym zu inhibieren. Bezüglich der Inhibition der RNase P aus dem Organismus *B. subtilis* (Typ B RNase P) sollten zwei Alternativen untersucht werden.

- (i) In Vorarbeiten wurden mit Hilfe von *Docking*-Experimenten und ribozymkinetischen Untersuchungen einige heterozyklische Verbindungen ermittelt, die eine Affinität für die zentrale Furche des P Proteins besitzen und auf diese Weise eine Bindung der 5'-Flanke der Prä-tRNA an das Protein blockieren sollten. In initialen Experimenten konnte tatsächlich eine Hemmung der RNase P-

Reaktion beobachtet werden. Dabei ist allerdings zu erwähnen, dass eine erkennbare Präzipitation der Substanzen unter den kinetischen Reaktionsbedingungen beobachtet wurde, sodass nicht gewährleistet war, dass die Reaktion in einer homogenen Phase stattfand. Daher wurden zunächst im Rahmen einer Kooperation mit der AG Prof. Dr. W. Diederich (FB Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) unter Beibehaltung des heterozyklischen Grundgerüsts Verbindungen mit verbesserter Wasserlöslichkeit synthetisiert, um die anfänglich beobachteten Inhibitionseffekte zu reproduzieren und Verbindungen mit verstärkten Hemmeffekten zu identifizieren.

- (ii) In einem alternativen Ansatz sollten bereits im Rahmen eines SELEX-Experimentes identifizierte Antisense-Oligonukleotide (durchgeführt durch PD Dr. Dagmar Willkomm, AG Hartmann) weiterentwickelt werden. Diese Oligonukleotide binden komplementär an die katalytisch aktive P RNA der RNase P aus *B. subtilis* im Bereich L5.1 und stören so eine essentielle Tertiärstrukturinteraktion zwischen L5.1 und L15.1 (siehe Abbildung 3). Die so entwickelten Oligonukleotide erwiesen sich als potente Inhibitoren, wenn sie mit der P RNA vor der Holoenzymbildung (d.h. vor Komplexierung von P RNA und P Protein) präinkubiert wurden. Wurden sie jedoch mit bereits präassembliertem Holoenzym getestet, konnte die initial beobachtete starke Inhibition nicht reproduziert werden. Daher sollte mit LNA-modifizierten Oligonukleotid-Varianten versucht werden, die Hemmwirkung auf das präassemblierte RNase P-Holoenzym zu verbessern, da LNA-modifizierte Oligonukleotide besser in RNA-Strukturen invadieren können als nicht modifizierte RNA-Oligonukleotide.<sup>34</sup> Im Rahmen von *in vivo* Komplementationsexperimenten sollte die funktionelle Bedeutung der L5.1:L15.1-Interaktion weiter herausgearbeitet werden.

### 1.3.2 Ein Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung von RNase P-Inhibitoren

Eine zum rationalen Design alternative Strategie, um Inhibitoren gegen ein bestimmtes Ziel zu entwickeln, sind Hochdurchsatzverfahren (*high throughput screening*, HTS). Dabei wird in einem massiv parallelisierten Verfahren nach inhibitorischen Substanzen gesucht, die in einer sog. Wirkstoffbibliothek enthalten sind. Eine solche Bibliothek enthält im industriellen Maßstab eine fünf- bis sechsstellige Zahl verschiedener Verbindungen, die mehr oder minder systematisch Variationen kritischer Parameter (wie z.B. Molekulargewicht, *log P*, Anzahl von

Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren) repräsentieren. Um ein solches HTS durchführen zu können, muss man über ein automatisiertes Verfahren verfügen, das entsprechend skalierbar und statistisch valide ist. Im Rahmen von Komplementationsstudien wurde ein Bakterienstamm (*E. coli* BW, entwickelt von Dr. Barbara Wegscheid, AG Hartmann) erzeugt, dessen endogene RNase P(-RNA) unter Kontrolle eines Arabinose-Promotors exprimiert wird. Das Bakterium kann dementsprechend lediglich in Arabinose-haltigem Nährmedium überleben, da ansonsten keine RNase P vorliegt. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit das Wachstum dennoch zu erhalten, indem man das Bakterium mit einem Plasmid transformiert, das eine heterologe RNase P(-RNA) kodiert (z.B. aus *B. subtilis*). So lässt sich messen, inwieweit diese heterologe RNase P die endogene RNase P aus *E. coli* ersetzen kann. Es konnte gezeigt werden, dass dies z.B. für das Enzym PRORP3 aus *A. thaliana* der Fall ist. Wie bereits beschrieben handelt es sich dabei um ein reines Protein und damit um ein im Vergleich zur bakteriellen RNase P architektonisch grundsätzlich verschiedenes Enzym. Da PRORP3 ein Homolog der katalytischen Proteinuntereinheit der humanen mitochondrialen RNase P ist, kann man dieses System also nutzen, um in einer Substanzbibliothek gezielt nach Verbindungen zu suchen, die spezifisch die bakterielle RNase P inhibieren, ohne die humane (mitochondriale) tRNA-Maturierung zu beeinträchtigen. Mit diesem Ansatz identifizierte Verbindungen könnten sich also als antibiotisch wirksame Substanzen mit resistenzbrechender Wirkung erweisen, da es bisher keine Antibiotika gibt, die die 5'-Prä-tRNA-Maturierung adressieren.

Um eine solche massiv parallelisierte Komplementationsstudie durchführen zu können, sollte zunächst eine notwendige Miniaturisierung des Systems vorgenommen werden. Es stellte sich heraus, dass die Messungen in 384-*well*-Platten durchgeführt werden können.

Es stand zudem die Klärung der Frage im Raum, ob es möglich ist, in einem entsprechend kleinen Maßstab noch Wachstumskurven durchzuführen, mit denen statistisch hinreichend robuste ( $Z'$ -Faktor) Effekte gemessen werden können. Anschließend an diese Vorarbeiten sollte am FMP Berlin (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, *Screening Unit*, AG Dr. Jens Peter von Kries) das *Screening* durchgeführt werden, bestehend aus den Schritten Assay-Transfer, Primär-Screen und Validierungs-Screen.

### 1.3.3 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus *A. thaliana*

Durch die Verwendung singular modifizierter Prä-tRNAs konnten in der Vergangenheit essentielle Beiträge zum Verständnis des Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P

erzielt werden (siehe 1.1.2 Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P und 1.2 Nukleinsäuremodifikationen).<sup>29,30,46–49</sup> Bei der vor kurzer Zeit entdeckten proteinogenen RNase P aus *A. thaliana* sind viele Aspekte des Reaktionsmechanismus noch unklar. Es konnte gezeigt werden, dass der pro-Rp-Sauerstoff im Gegensatz zur bakteriellen RNase P keinen kritischen Einfluss auf die Spaltstellen-Selektion und die Kinetik der Prä-tRNA-Prozessierung hat.<sup>50</sup> Dieser Befund weist auf substantielle Unterschiede im Reaktionsmechanismus der bakteriellen und proteinogenen RNase P hin. In diesem Zusammenhang wurde eine essentielle Bedeutung des pro-Sp-Sauerstoffs diskutiert, auf die nicht nur kinetische Untersuchungen, sondern auch eine Kristallstrukturanalyse des Enzyms PRORP1 hinweist.<sup>25</sup>

Vor diesem Hintergrund sollten Prä-tRNAs mit gezielten Modifikationen an der Spaltstelle verwendet werden, um im Rahmen einer vergleichenden Analyse Beiträge zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus des Enzyms PRORP3 zu leisten. Dazu war es zunächst notwendig, die Ligationsstrategie zu reetablieren, um singulär modifizierte Prä-tRNA-Moleküle zu erhalten. Anschließend sollten die Schnittstellen der verschiedenen modifizierten Prä-tRNAs kartiert werden. Zusätzlich sollte untersucht und evaluiert werden, inwieweit ein potentieller *rescue*-Effekt bezüglich des Sp-Phosphorothioates auf einen pro-Sp-Sauerstoff-Magnesium-Kontakt hinweist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

ÄKTA Proteinaufreinigungssystem	(Amersham Biosciences)
Autoklav	V 95 (Systec)
Bidestilliertes Wasser	Destamat (Heraeus)
Brutschrank	(Mettler)
Elektrophorese-Spannungsquellen	Power Pack 3000 (Biorad)
Fast Prep	(MP)
Gelapparaturen	PAA-Gele: Feinmechanik (Universität Marburg)
Geldokumentationssystem	Dark Hood DH 50 (Biostep)
	Gerix 1000 (Biostep)
	Transilluminator (Biostep)
GS-800 Calibrated Densitometer	(BIO-RAD)
Heizblock	Dri-Black DB-3D (Techme)
Inkubator	3033 (GFL)
Kontaminationsmonitor	LB 122 (Berthold)
Kühl- und Gefrierschränke	4°C: Superöko (Privileg)
	-20°C: Superöko (Privileg)
	-80°C: (Heraeus)
Laboruhr	(Junghans)
Microtiter Photometer	Safire 2 (Tecan) und Multiskan GO (Thermo Scientific)
Mikrowelle	8020 E (Privileg)
PCR-Gerät	TGradient und T1 Thermocycler (Biometra)
Photometer	BioMate 3 (Thermo Spectronic) und 7305 (JENWAY)
Pipetten	(Eppendorf und Abimed)
Quarzküvetten	(Hellma)
SDS-Gele	Mini-PROTEAN (Biorad)
Storage Phosphor	Scanner: FLA 3000 (Fujifilm)
	Eraser: (Raytest)
	Imaging Plate BAS-MS 2040 (Fujifilm)

Vortex-Mixer	7-2020 ( <i>Neolab</i> )
Waagen	( <i>Sartorius</i> )
Zentrifugen	5810 R ( <i>Eppendorf</i> )
	mini spin ( <i>Eppendorf</i> )

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

384-well-Platten	( <i>Greiner bio-one</i> )
96-well-Platten	( <i>Sarstedt</i> )
Amicon Konzentratoren	( <i>Merck Millipore</i> )
Aufreinigungssäulchen Oligos	NAP-25 ( <i>GE Healthcare</i> )
CM-Säulen	HiTrap FF ( <i>GE Healthcare</i> )
COMplete Protease Inhibitor	( <i>Roche</i> )
Dialyseschlauch	( <i>Roth</i> )
Einmalküvetten	( <i>Sarstedt</i> )
Filter	( <i>Sarstedt</i> )
Gelextraktion Kit	Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system ( <i>Promega</i> )
Glasperlen	( <i>Biospec</i> )
Petrischalen	( <i>Sarstedt</i> )
Pipettenspitzen	( <i>Sarstedt</i> )
Plasmid DNA Präparation Kit	GeneJET Plasmid Miniprep Kit ( <i>Thermo Scientific</i> )
Reagiergefäße	( <i>Sarstedt</i> )
Reagierröhre	( <i>Greiner bio-one</i> )
Skalpell	( <i>B. Braun</i> )

### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

2-log ladder	( <i>New England Biolabs</i> )
Acrylamid 50% M-Bis	( <i>Gerbu</i> )
Agar	( <i>Serva</i> )
Agarose	( <i>Roth</i> )
Ammoniumperoxodisulfat	( <i>Roth</i> )
<i>Bam</i> HI	( <i>Thermo Scientific</i> )

Bovines Serumalbumin	( <i>Sigma Aldrich</i> )
Bradfordreagenz	( <i>Biorad</i> )
Bromphenolblau	( <i>Merck</i> )
Dikaliumhydrogenphosphat	( <i>Roth</i> )
Dithiothreitol	( <i>Gerbu</i> )
DMSO	( <i>Roth</i> )
DNase I	( <i>Thermo Scientific</i> )
<i>DpnI</i>	( <i>Thermo Scientific</i> )
<i>DraI</i>	( <i>Thermo Scientific</i> )
EDTA	( <i>Gerbu</i> )
Ethanol	( <i>Roth</i> )
Ethidiumbromid	( <i>Roth</i> )
FastAP	( <i>Thermo Scientific</i> )
Guanosin	( <i>Roth</i> )
HEPES	( <i>Gerbu</i> )
Isopropanol	( <i>Roth</i> )
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	( <i>Roth</i> )
Kaliumdihydrogenphosphat	( <i>Fluka</i> )
Magnesiumacetat	( <i>Roth</i> )
Magnesiumchlorid	( <i>Fluka</i> )
MES	( <i>Roth</i> )
Natriumacetat	( <i>Grüssing</i> )
Natriumchlorid	( <i>Fluka</i> )
Natriumdihydrogenphosphat	( <i>Riedel de Hën</i> )
Natriumdodecylsulfat	( <i>Biomol</i> )
Natriumhydroxid	( <i>Fluka</i> )
Nucleotidtriphosphate	( <i>Roth</i> )
Page Ruler Plus Protein marker	( <i>Thermo Scientific</i> )
PEG-550 Monomethylether	( <i>Hampton Research</i> )
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	( <i>Thermo Scientific</i> )
Pyrophosphatase	( <i>Roche</i> )
Spermidin	( <i>Roth</i> )
SYBR Gold	( <i>Invitrogen</i> )
SYPRO Orange	( <i>Sigma Aldrich</i> )



T4 DNA Ligase	( <i>Thermo Scientific</i> )
T4 Polynukleotidkinase	( <i>Thermo Scientific</i> )
T4 RNA Ligase 2	( <i>New England Biolabs</i> )
T4 RNA Ligase	( <i>Thermo Scientific</i> )
T7 RNA-Polymerase	(Präparation AG Hartmann, <i>Universität Marburg</i> )
Tetramethylethyldiamin	( <i>Roth</i> )
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	( <i>Gerbü</i> )
Urea	( <i>Gerbü</i> )
<i>Xba</i> I	( <i>Thermo Scientific</i> )
Zinksulfat	( <i>Sigma Aldrich</i> )
$\beta$ -Mercaptoethanol	( <i>Roth</i> )

#### 2.1.4 Nukleinsäuren und Oligonukleotide

LNA-modifizierte Nukleotide (*locked nucleic acids*) wurden in Fett hervorgehoben. Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich bei den übrigen Nukleotiden um Ribonukleinsäuren. Desoxyribonukleinsäuren wurden mit dem Präfix d markiert. 2'-Ribosemodifikationen wurden durch eckige Klammern um das betreffende Nukleotid angegeben. Phosphorothioat-Modifikationen wurden durch einen Schrägstrich zwischen den betreffenden Nukleotiden angegeben.

##### 2.1.4.1 Oligonukleotide für die Ligation von Vorläufer-tRNAs

13-mer:	5'-CCC UUU CGC GGG A-3'
13-mer (2'-F):	5'-CCC UUU [C]GC GGG A-3'
13-mer (2'-H):	5'-CCC UUU [C]GC GGG A-3'
13-mer (2'-OCH <sub>3</sub> ):	5'-CCC UUU [C]GC GGG A-3'
13-mer (Rp/Sp):	5'-CCC UUU C/GC GGG A-3'
24-mer (2'-NH <sub>2</sub> ):	5'-CCC UUU [C]GC GGG AGU AGC UCA GUC-3'
11-mer:	5'-GUA GCU CAG UC-3'
DNA-splint 42-mer:	5'-GCA AGG TCG TGC TCT ACC GAC TGA GCT ACT CCC GCG AAA GGG-3'

DNA-*splint* 81-mer: 5'-GAG CGG GAG ACG GGA CTT GAA CCC GCG ACC CCG  
ACC TTG GCA AGG TCG TGC TCT ACC GAC TGA GCT ACT  
CCC GCG AAA GGG-3'

Das 24-mer (2'-NH<sub>2</sub>)-Oligonukleotid wurde von Prof. Dr. F. Eckstein vom MPI Göttingen und die Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide von Prof. Dr. Tatjana Oretskaya, Fachbereich Chemie der Lomonossow-Universität Moskau zur Verfügung gestellt. Die übrigen Oligonukleotide wurden von *IDT* oder *Purimex* bezogen.

#### 2.1.4.2 Antisense-Oligonukleotide

AS1: 5'-GGC AUC UCA GCA CCG UGC GA-3'  
AS1-LNA: 5'-GGC AUC UCA GCA CCG UGC GA-3'  
AS3-LNA: 5'-ACA CUA CGG GCA UCU CAG CAC-3'  
AS4-LNA: 5'-CdCC dTAC CdAdA dAdAT dTT-3'

Die Oligonukleotide wurden von *EXIQON* oder *IDT* bezogen.

#### 2.1.4.3 Verwendete PCR-Primer

PRORP3-Fwd: 5'-GAT CGG ATC CTA TCC TAA CAG CAC AAG AGC GGA A-3'  
PRORP3-Rev: 5'-GCT CTA GAA GGA AAT GAT GAC CTC GTT TCC ACC-3'

pDW66\_d15.1-Fwd: 5'-CGA AGG GAA GGT TCC CCT ACC AAA ATT TG-3'  
pDW66\_d15.1-Rev: 5'-GGG AAG GAC AGA ATG CTT TCT GTA G-3'

Die PCR-Primer wurden von der Firma *metabion* bezogen.

#### 2.1.4.4 Sonstige Nukleinsäuren und Oligonukleotide

Für radioaktive 5'-Markierungen wurde ATP verwendet, welches in  $\gamma$ -Position ein radioaktives Phosphor-(32)-Isotop enthielt ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP). Die spezifische Aktivität betrug

3000 Ci/mmol, die radioaktive Konzentration 10 mCi/mL. Es wurde stets von der Firma *Hartmann Analytik* bezogen.

Als Größenstandard wurden in verschiedenen Experimenten die Oligonukleotide 3034 und 3035 eingesetzt. Sie wurde von Prof. Dr. F. Eckstein vom MPI Göttingen zur Verfügung gestellt.

3034: 5'-CCC UUU-3'

3035: 5'-CCC UUU dC-3'

## 2.1.5 Plasmide und Bakterienstämme

### 2.1.5.1 Plasmide

Bezeichnung	Verwendung	linearisiert mit	Ref.
pUC19_PRORP	RNase P Komplementation		
pDG	RNase P Komplementation	-	51
pACYC_ <i>E.c. rnpB</i>	RNase P Komplementation	-	52
pACYC_ <i>B.sub. rnpB</i>	RNase P Komplementation		
pACYC_ <i>B.sub. rnpB</i> d15.1	RNase P Komplementation		
pDG_PRORP	RNase P Komplementation	-	8
pDW66	<i>in vitro</i> Transkription von <i>B. subtilis</i> P RNA	<i>DraI</i>	30
pSBpt3 <sup>hh</sup>	<i>in vitro</i> Transkription von ptRNA <sup>Gly</sup> aus <i>T. thermophilus</i>	<i>BamHI</i>	53
pt+18	<i>in vitro</i> Transkription von ptRNA <sup>Gly</sup> aus <i>T. thermophilus</i> ab Position +18	<i>BamHI</i>	29
pPWT1	Überexpression P Protein aus <i>B. subtilis</i>	-	54
pQL30	Überexpression P Protein aus <i>B. subtilis</i>	-	55

## 2.1.5.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendung	Ref.
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	Vermehrung und Präparation von Plasmiden	-
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Überexpression von Proteinen	-
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Überexpression von Proteinen	54,56
<i>E.coli</i> BW	Komplementationsexperimente	8,52
<i>E.coli</i> AS19	Komplementations- und Hemmhofexperimente	34,57
<i>E. coli</i> JM 109	Überexpression P Protein aus <i>B. subtilis</i>	55

## 2.1.6 Puffer und Lösungen

Methodenrelevante Puffer werden in den entsprechenden Kapiteln beschrieben. Puffer für die Gelelektrophorese und mikrobiologische Medien wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Alle übrigen Puffer und Lösungen wurden mit doppelt-destilliertem Wasser (dd H<sub>2</sub>O) hergestellt. Vor der Verwendung wurden sämtliche Puffer steril filtriert und Medien autoklaviert (121 °C, 2.0 bar, 15 min; Ausnahme: Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese).

2×PPF:                    0.02% (v/v) Bromphenolblau  
                               0.02% (v/v) Xylencyanolblau  
                               2.6 M Harnstoff  
                               66% (v/v) Formamid  
                               2×TBE

5×TBE:                    445 mM Tris  
                               445 mM Borsäure  
                               10 mM EDTA

LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton
	5 g/L Bacto-Hefe-Extrakt
	10 g/L NaCl
	0.4 mL/L NaOH (10 M)

Um Agar-Platten zu gießen, wurde vor dem Autoklavieren 1.5% (w/v) Agar zugegeben.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.1.1 Rekombinante Überexpression des RNase P Proteins aus *B. subtilis*

Das RNase P Protein aus *B. subtilis* wurde mit zwei verschiedenen Methoden überexprimiert und aufgereinigt. Methode (i) basiert auf einer heterologen Überexpression in *E.coli* JM109\_pQL30-Bakterien. Das gewonnene Protein verfügt über einen *His<sub>6</sub>-Tag*, was eine affinitätschromatographische Aufreinigung erlaubte. Die Präparation wurde wie beschrieben in einem Ni-NTA *batch*-Verfahren durchgeführt.<sup>55</sup> Die Zellen wurden in SB-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 300 mM NaCl; 0.1% Triton X-100; 1000 mM NH<sub>4</sub>Cl; 1 Tablette COMplete Protease Inhibitor, Roche) resuspendiert (10 mL SB-Puffer/300 mL pelletierte Bakterienkultur), 15 min sonifiziert und anschließend 30 min bei 4°C und 8000 rpm zentrifugiert. Das zellfreie Lysat wurde auf eine mit SB-Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Matrix aufgetragen und 2 h bei 4°C über Kopf rotiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Ni-NTA-Agarose wurde nun in 500 µL eiskaltem WB-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 30 mM Imidazol; 8 M Urea; 0.1% Triton X-100) resuspendiert und 4 × mit 1 mL eiskaltem WB-Puffer gewaschen (Zentrifugation 2 min bei 4°C und 5000 rpm). Zur Elution des P Proteins wurde 500 µL EB-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7; 300 mM Imidazol; 7 M Urea; 20 mM EDTA; 10% v/v Glycerol) zugegeben und 45 min bei 4°C über Kopf rotiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand in einen Dialyseschlauch (regenerierte Zellulose MWCO 6000-8000, Roth) überführt und 3 × gegen DB-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7; 100 mM NaCl; 10% v/v Glycerol) dialysiert (2 × 1h, 1 × ü.N., jeweils bei 4°C).

Methode (ii) basiert ebenfalls auf einer heterologen Überexpression, allerdings in *E. coli* BL21\_pLysS\_pPWT1. Das auf diese Weise präparierte P Protein wurde vor allem für die Kristallisationsexperimente verwendet. Die Aufreinigung wurde nach einer adaptierten

publizierten Methode durchgeführt.<sup>54</sup> Die geernteten Zellen wurden in Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM EDTA; 10% v/v Glycerol; 1 Tablette COMplete Protease Inhibitor) resuspendiert (50 mL Lyse-Puffer/1 L pelletierte Bakterienkultur) und nach Zusatz von Glasperlen (10% v/v) mit zwei FastPrep (4 m/s, 20 s) Durchläufen aufgeschlossen und anschließend für 1 h bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 2×Puffer A (1×Puffer A: 50 mM Natriumacetat, pH 6.5; 5 mM EDTA; 0.1 M NaCl; 5 M Urea) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf eine mit Puffer A äquilibrierte CM-Sepharose-Säule (5 mL Säulenvolumen) aufgetragen und mit mindestens zwei Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution des P Proteins erfolgte mit Puffer A, der 1 M NaCl enthielt. Die Fraktionen, die das P Protein enthielten, wurden vereinigt und 3 × gegen 1 L Puffer B (50 mM Natriumacetat, pH 6.5; 5 mM EDTA; 0.1 mM NaCl) bei 4°C dialysiert. Das Dialysat wurde erneut auf eine mit Puffer B äquilibrierte CM-Sepharose-Säule aufgetragen und mit mindestens zwei Säulenvolumen Puffer B, der 0.25 M NaCl enthielt gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 mL eines linearen NaCl-Gradienten (0.25 – 1 M NaCl). Die Fraktionen, die P Protein enthielten, wurden vereinigt und 3 × gegen jeweils 1 L 10 mM Tris-HCl, pH 8 bei 4°C dialysiert.

Das hergestellte RNase P Protein wurde anschließend auf seine Qualität und Konzentration hin untersucht (2.2.1.5 SDS-PAGE und 2.2.1.4 Bestimmung der Protein-Konzentration). Bis zur weiteren Verwendung wurde es bei 4°C (Methode ii) oder -80°C (Methode i) gelagert.

#### 2.2.1.2 Kristallisation des RNase P Proteins aus *B. subtilis*

Die Kristallisation des RNase P Proteins aus *B. subtilis* erfolgte wie in *Stams et al* beschrieben.<sup>23</sup> Um die publizierten Bedingungen (Präzipitationspuffer Kristallform I: 20% PEG-Monomethylether ( $M_n$  550); 25 mM ZnSO<sub>4</sub>; 100 mM MES, pH 6.25; Präzipitationspuffer Kristallform II: 23% PEG-Monomethylether ( $M_n$  550); 10 mM ZnSO<sub>4</sub>; 100 mM MES, pH 6.25) zu reproduzieren, wurde ein engmaschiges Gitter um die publizierten Bedingungen angelegt, bei dem die PEG-Konzentration und der pH-Wert variiert wurden (PEG 16% v/v - 24% v/v, pH-Wert 6.0 - 6.5). Die Kristallisation erfolgte im *hanging drop*-Verfahren bei Raumtemperatur. Es wurden 5 µL Proteinlösung (in 10 mM Tris-HCl, pH 8) mit 5 µL Präzipitationspuffer vermischt und über einem mit 1 mL Präzipitationspuffer gefüllten Reservoir befestigt.

### 2.2.1.3 Thermal shift assay RNase P Protein aus *B. subtilis*

Durch die ligandenvermittelte Verschiebung der thermischen Entfaltung eines Proteins sind Rückschlüsse auf die Affinität des Liganden zum Protein möglich.<sup>58,59</sup> 36.5 µL TSA-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8; 2:1000 SYPRO Orange) wurden mit 2 µL DMSO bzw. Inhibitorlösung und 1.5 µL *B. subtilis* RNase P Protein (16 mg/mL) in der Vertiefung einer 96-well Mikrotiter-Platte vermischt und anschließend im qPCR-Gerät mit dem Programm „Schmelzkurve-Standard“ vermessen (Starttemperatur 20 °C, Endtemperatur 80 °C; Inkrement: 0.5 °C/min).

### 2.2.1.4 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration basierte auf dem Bradford-Test.<sup>60</sup> Für die Bestimmung der Referenz-Kurve wurde Rinder-Serum-Albumin (BSA) in Endkonzentrationen von 0 µg/mL bis 20 µg/mL verwendet. Für die eigentlichen Messproben wurden in der Regel 1 µL bis 10 µL der jeweiligen Proteinlösung eingesetzt. Sämtliche Referenz- und Messproben wurden zunächst mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 800 µL gebracht, dann mit Bradford-Reagenz (200 µL) versetzt und vollständig durchmischt, gefolgt von einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und anschließender Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm.

### 2.2.1.5 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamide gel electrophoresis*) wurde zur elektrophoretischen Trennung von Proteingemischen nach Molekülgröße eingesetzt. Dazu werden die Proben initial in einem denaturierenden Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS (w/v); 1.4 M β-Mercaptoethanol; 0.05% (v/v) Bromphenolblau) 5 min auf 95°C erhitzt, um eine möglichst vollständige Denaturierung der Proben zu erreichen. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Proben auf das Gel geladen. Standardmäßig wurden im Rahmen dieser Arbeit 15%ige SDS-Gele verwendet. Sammel- und Trenngel setzten sich wie folgt zusammen:

Sammelgel:	1.8 mL 4×Sammelgelpuffer (Zusammensetzung s.u.) 1 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30%ige Lösung) 75 µL APS (10% w/v) 7.5 µL TEMED ad 7.5 mL ddH <sub>2</sub> O
Trenngel:	4 mL 4×Trenngelpuffer (Zusammensetzung s.u.) 8 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30%ige Lösung) 160 µL APS (10% w/v) 16 µL TEMED ad 16 mL ddH <sub>2</sub> O
4×Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 0.6% SDS (w/v)
4×Trenngelpuffer:	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 0.6% SDS (w/v)
SDS-Laufpuffer:	Rotiphorese 10×SDS-PAGE ( <i>Roth</i> )

Nachdem die Proben und der Größenmarker (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, 10-250 kDa; *Thermo Scientific*) auf das Gel aufgetragen worden waren, wurde die Elektrophorese ca. 1 h bei 180 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Brilliant-Blue G250 ca. 30 min unter leichtem Schwenken angefärbt und zum Entfärben in H<sub>2</sub>O geschwenkt.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Für verschiedene molekularbiologische Anwendungen ist der Einsatz 5'-phosphorylierter Nukleinsäuren notwendig (z.B. Ligation oder auch Primer für verschiedene PCR-Strategien). Das nachfolgende Schema zeigt einen exemplarischen Reaktionsansatz:



0.5 µL Substrat (z.B. Primer 100 pmol/µL)  
 2 µL PNK-Puffer A  
 2 µL ATP (10 mM)  
 1 µL T4 PNK (10 U/µL)  
 ad 20 µL ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 75°C Hitze-inaktiviert. Für die weitere Verwendung im Rahmen von PCR-Reaktionen wurden die Primer ohne weitere Aufarbeitung direkt eingesetzt (2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion). Für die Verwendung im Rahmen von Ligationen (2.2.2.7 Ligation von RNA) wurde zunächst eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt (2.2.2.15 Phenol/Chloroform-Extraktion).

#### 2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase chain reaction*) diente zur Amplifikation von DNA-Fragmenten im Rahmen von Klonierungen. Ein exemplarischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2.5 µL 10×Pfu-Puffer  
 2 µL fwd-Primer (10 pmol/µL)  
 2 µL rev-Primer (10 pmol/µL)  
 2 µL Templat (100 ng/µL)  
 0.5 µL dNTPs (10 mM jeweils)  
 0.5 µL Pfu Polymerase (2.5 U/µL)  
 ad 25 µL ddH<sub>2</sub>O

Nach der Vereinigung aller Komponenten wurde folgendes Temperaturzyklus-Programm appliziert:

180 s bei 95 °C Initiale Denaturierung		
30 s bei 95 °C Denaturierung	}	30×
30 s bei 53-58 °C <i>Annealing</i>		
240-480 s bei 72 °C Extension		
600 s bei 72 °C finale Extension		

Die PCR-Ansätze wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut (2.2.2.3 *DpnI*-Verdau von PCR-Produkten) und über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.12 Agarosegelelektrophorese) aufgereinigt.

#### 2.2.2.3 *DpnI*-Verdau von PCR-Produkten

Der *DpnI*-Verdau diente dazu, nach einer PCR die Matrizen-DNA abzubauen, da *DpnI* spezifisch 5'-GATC-Sequenzen mit methylierten Adeninen hydrolysiert. Im Fall einer PCR trägt ausschließlich die Templat-DNA solche Methylierungen. Folgender Reaktionsansatz wurde dazu vorbereitet:

20  $\mu\text{L}$  PCR-Ansatz  
3  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Tango-Puffer  
3  $\mu\text{L}$  *DpnI* (10 U/ $\mu\text{L}$ )  
ad 30  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 5 min bei 80°C Hitze-inaktiviert.

#### 2.2.2.4 Analytischer Verdau von DNA

Der analytische Verdau von DNA wurde verwendet, um nach einer Plasmidpräparation (2.2.2.16 Plasmidpräparation) den Klonierungserfolg zu überprüfen, indem die resultierenden Fragmente auf ein korrektes Schnittmuster hin analysiert wurden. Nachfolgend ist ein standardmäßig verwendeter Reaktionsansatz beschrieben:

1  $\mu\text{L}$  Substrat (Eluat aus Plasmidpräparation)  
1  $\mu\text{L}$  10 $\times$ FD-Puffer  
0.5  $\mu\text{L}$  je *Fast Digest* Restriktionsenzym  
ad 10  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5 min bei 80°C Hitze-inaktiviert. Die Analyse erfolgte auf einem 1%igem Agarosegel (2.2.2.12 Agarosegelelektrophorese).

#### 2.2.2.5 Präparativer Verdau von DNA

DNA wurde präparativ verdaut, um linearisierte Matrizen für *in vitro* Transkriptionen herzustellen, oder um Vektor und Insert im Rahmen von Klonierungen auf eine Ligation vorzubereiten. Dazu wurde standardmäßig folgendes Pipettierschema verwendet:

100 µg DNA-Substrat  
8 µL 10×Reaktionspuffer  
100 U Restriktionsenzym *Fast Digest*  
ad 80 µL ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für 1.5 h bei 37°C inkubiert und anschließend Hitze-inaktiviert (entsprechend der Vorgabe des Restriktionsenzym-Herstellers). Zur Aufarbeitung schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an (2.2.2.15 Phenol/Chloroform-Extraktion) an.

#### 2.2.2.6 Ligation von DNA

Im Rahmen von Klonierungsarbeiten war es notwendig, hergestellte DNA-Fragmente in einen Plasmid-Vektor einzufügen. Voraussetzung für eine Ligation war, dass beide Komponenten im Vorfeld mit denselben Restriktionsenzymen (oder solchen, die kompatible Enden liefern) verdaut wurden (2.2.2.5 Präparativer Verdau von DNA). Folgender Ansatz wurde verwendet:

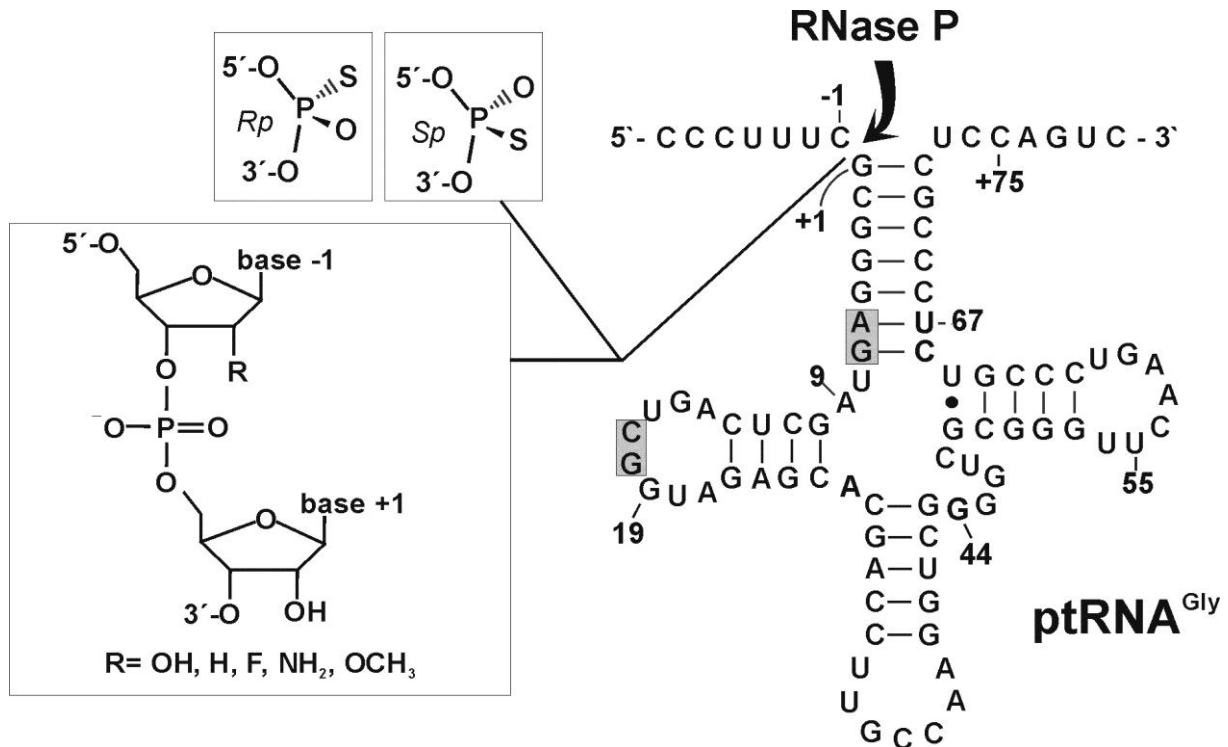
1 µL linearisierter Vektor  
5 µL Insert  
1 µL 10×Ligase-Puffer  
1 µL T4 DNA-Ligase (5 U/µL)  
ad 10 µL ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für eine chemische Transformation verwendet (2.2.4.1 Transformation von Bakterien).

#### 2.2.2.7 Ligation von RNA

Die Ligation von RNA-Oligonukleotiden wurde ausschließlich mit Hilfe von DNA-Brückenoligonukleotiden durchgeführt (sog. *splint*-Strategie). Sie wurde genutzt, um singulär

modifizierte Prä-tRNA-Moleküle zu erzeugen, die an ihrer kanonischen RNase P-Spaltstelle eine Phosphorothioat- oder 2'-Ribose-Modifikation besitzen (Abbildung 7 bzw. 3.3 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus *A. thaliana*).



**Abbildung 7:** Darstellung des per *splint*-Ligation erzeugten singularär modifizierten Prä-tRNA-Moleküls. Es wurden Phosphorothioat-Modifikationen (in Rp- oder Sp-Konfiguration) oder 2'-Ribose-Modifikationen eingefügt. Die Ligationsstellen sind mit grau unterlegten Kästchen markiert. Der verwendete DNA-*splint* ist komplementär zu den Nukleotiden -7 bis +35 der Prä-tRNA<sup>Gly</sup>. Die Abbildung ist dem Manuskript "Analysis of the cleavage mechanism by protein-only RNase P using precursor tRNA substrates with modifications at the cleavage site" (3.3 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus *A. thaliana*) entnommen.

Die beiden zu ligierenden RNA-Fragmente wurden zunächst an einen komplementären DNA-Strang hybridisiert und anschließend mit Hilfe einer Ligase ligiert. Dazu wurde T4 DNA-Ligase oder T4 RNA-Ligase 2 verwendet. Folgender Ansatz wurde für die Hybridisierung verwendet (exemplarisch ist hier die Verwendung von T4 RNA-Ligase 2 gezeigt; die Volumina können aufgrund der unterschiedlichen Enzymaktivitäten variieren):

60 pmol 13-mer (Nt -7 bis +6 in Abb. 7)

60 pmol 11-mer (Nt 7 bis 17 in Abb. 7)

60 pmol DNA-*splint*

1 µL 5'-markiertes 11-mer

ad 17 µL ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für 2 min auf 85°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Dann wurden 2 µL 10×Ligase-Puffer und 1 µL Ligase (10 U/µL) hinzugefügt und der Ansatz 1.5 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 60 pmol kinasiertes (5'-phosphoryliertes) Prä-tRNA<sup>Gly</sup>+18-RNA-Fragment (5'-Ende an Position +18 der Prä-tRNA<sup>Gly</sup>, Abbildung 7) dazugegeben (2.2.2.1 Phosphorylierung von Nukleinsäuren) und der Ansatz erneut für 2 min auf 85°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Nun wurden 5 µL ddH<sub>2</sub>O, 2 µL 10×Ligase-Puffer und 1 µL Ligase hinzupipettiert und die Probe erneut für 1.5 h bei 37°C inkubiert. Der DNA-*splint* wurde im Anschluss durch Zugabe von 2 µL DNase I (RNase-frei, 50 U/µL) und Inkubation für 1 h bei 37°C abgebaut. Es folgte eine Hitze-inaktivierung der DNase I für 5 min bei 75°C und das Ligationsprodukt wurde anschließend über ein präparatives PAA-Gel aufgereinigt (2.2.2.13 PAA-Gelelektrophorese).

#### 2.2.2.8 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Um RNA-Moleküle auf 5'-Markierungsexperimente vorzubereiten, mussten sie zunächst am 5'-Ende dephosphoryliert werden. Dazu wurde Alkalische Phosphatase (Fast-AP, *Fermentas*) verwendet. Ein exemplarischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 µg RNA-Substrat (z.B. Prä-tRNA<sup>Gly</sup>)  
5 µL 10×FastAP-Puffer  
3 µL FastAP (1 U/µL)  
ad 50 µL ddH<sub>2</sub>O

Es wurde für 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend erneut 3 µL FastAP hinzugefügt und für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde für 5 min bei 75°C Hitze-inaktiviert und der Ansatz im Rahmen der weiteren Aufarbeitung einer Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.2.15 Phenol/Chloroform-Extraktion) unterzogen.

#### 2.2.2.9 Fällung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren zu präzipitieren, wurde die entsprechende Lösung mit dem 2-fachen Volumen Isopropanol versetzt und 15 min bei Raumtemperatur sowie mind. 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde 1 h bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300 µL 75%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter

Zentrifugation (15 min, 4°C und 13000 rpm) wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet 5 min bei 37°C Luft-getrocknet und anschließend in einer sinnvollen Menge ddH<sub>2</sub>O resuspendiert (i.d.R. 5-50 µL). Um die Fällungseffizienz zu erhöhen wurde insbesondere im Fall sehr kurzer Oligonukleotide Glycogen (20 mg/mL) im Zuge der Isopropanolfällung hinzugefügt.

#### 2.2.2.10 *in vitro* Transkription

Die T7 *in vitro* Transkription wurde zur enzymatischen Synthese von RNA durch Umschreiben eines linearisierten DNA-Templates verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

6.7 µL MgCl<sub>2</sub> 3 M  
 80 µL Hepes 1 M pH 7.5  
 10 µL Spermidin 100 mM  
 50 µL DTT 100 mM  
 5 µL Pyrophosphatase 1 mg/mL  
 6 µL BSA 20 mg/mL  
 80 µg linearisiertes Templat  
 150 µL NTP-Mischung jeweils 25 mM  
 20 µL T7 RNA-Polymerase  
 ad 1000 µL ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert, dann erneut das gleiche Volumen T7 RNA Polymerase hinzugefügt und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1000 µL 2×PPF abgestoppt und der Ansatz über ein präparatives PAA-Gel aufgereinigt (2.2.2.13 PAA-Gelelektrophorese).

#### 2.2.2.11 Radioaktive 5'-Markierung von Nukleinsäuren

Zur radioaktiven 5'-Markierung von Nukleinsäuren ist es notwendig, dass sie am 5'-Ende desphosphoryliert vorliegen, da während der Markierung ein radioaktives Phosphatisotop (<sup>32</sup>P) übertragen werden soll. Folgender Ansatz wurde standardmäßig verwendet:

30 pmol Substrat (z.B. Prä-tRNA<sup>Gly</sup>)  
1 µL T4 PNK 10×Puffer  
3 µL  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP  
2 µL T4 PNK (10 U/µL)  
ad 10 µL ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 10 µL 2×PPF (2.1.6 Puffer und Lösungen) abgestoppt. Zur Aufreinigung der markierten RNA schloss sich ein präparatives denaturierendes PAA-Gel an (2.2.2.13 PAA-Gelelektrophorese). Die Produktbande wurde mithilfe von Autoradiographie detektiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelelution in 1 M NaOAc erfolgte über Nacht bei 4°C und 950 rpm in einem Thermoschüttler. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben (2.2.2.9 Fällung von Nukleinsäuren).

#### 2.2.2.12 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde hauptsächlich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Rahmen von Klonierungsarbeiten eingesetzt. Standardmäßig wurden 1%ige-Agarosegele verwendet. Nach dem Einwiegen der Agarose wurde ein entsprechendes Volumen 1×TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA) hinzugefügt und in der Mikrowelle erhitzt, um die Agarose zu lösen. Anschließend wurde Ethidiumbromid dazugegeben (Endkonzentration ca. 500 ng/mL) und die Lösung in eine Form gegossen. Die Kamm- bzw. Taschengröße wurde je nach beabsichtigter Verwendung einem analytischen oder präparativen Maßstab angepasst. Nachdem die Agarose erkaltet war, wurden die DNA-Proben mit dem gleichen Volumen 2×DNA-Probenpuffer (100 mM Tris-HCl; pH 7.5; 50 mM EDTA; 70% Glycerin (v/v); 0.05% Bromphenolblau (w/v); 0.05% Xylencyanolblau (w/v)) gemischt, in die Geltaschen geladen und die Gelelektrophorese bei 80 mA für ca. 1 h durchgeführt. Als Größenmarker wurde 2-log DNA-ladder (0.1-10.0 kb) verwendet. Die Banden wurden anschließend mit Hilfe eines UV-Dokumentationssystems visualisiert. Im Fall eines präparativen Agarosegels wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe einer Gelelution (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) nach Herstellerangaben isoliert.

### 2.2.2.13 PAA-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA-Fragmenten war eine zentrale Methode im Rahmen dieser Arbeit und wurde in verschiedensten Ausführungen eingesetzt. Üblicherweise wurden denaturierende Gele verwendet, während die Acrylamidkonzentration zwischen 8% und 25% variiert wurde. Für Acrylamidkonzentrationen zwischen 8% und 20% wurde eine Stammlösung verwendet, die gegebenenfalls verdünnt wurde (40% (v/v) Polyacrylamid-Stammlösung 50% M-Bis; 8 M Harnstoff; 1×TBE). Sollte die Acrylamidkonzentration unter 20% liegen, wurde mit äquivalenter Harnstofflösung verdünnt (Verdünnungslösung: 8 M Harnstoff; 1×TBE). Es kamen verschiedene Gelformate zum Einsatz (B×H×D: 10.5 cm×11 cm×1 mm- 30 cm×40 cm×1 mm) und das Acrylamidvolumen wurde für jedes Format entsprechend angepasst.

Nachdem die Glasplatten für das jeweilige Gel vorbereitet worden waren, wurde die Polymerisation der entsprechenden PAA-Lösung mit TEMED (1:1000) und APS (1:100) gestartet und die Lösung ruhig aber zügig, jedoch ohne Einschluss von Luftblasen, zwischen die geklammerten Gelplatten gegossen. Der Kamm wurde je nach Probenanzahl bzw. Gelzweck (präparativ oder analytisch) gewählt. Nachdem die Polymerisation abgeschlossen war (ca. 30 min), wurde das ausgehärtete Gel in eine der Größe entsprechende Gelkammer eingespannt und die Proben (nach Mischen mit dem gleichen Volumen 2×PPF) appliziert. Anschließend wurde mit 1×TBE überschichtet und die Elektrophorese mit einer an das jeweilige Gel angepassten Stromstärke durchgeführt (10 mA- 30 mA). Als Größenreferenz wurde eine RNA bekannter Größe verwendet. Zur Visualisierung der resultierenden Banden kamen verschiedene Techniken zum Einsatz. Im analytischen Fall wurde das Gel entweder mit Ethidiumbromid angefärbt und mit einem UV-Detektionssystem visualisiert und dokumentiert. Waren die Proben radioaktiv markiert, konnte alternativ eine Autoradiographie vorgenommen werden. Dazu wurde für 1 h bis über Nacht eine Phospho-Imager-Platte in einer Licht-undurchlässigen Kassette auf das Gel gelegt. Anschließend wurde die Platte mit einem dafür geeigneten Scanner abgelesen und die Banden dokumentiert sowie gegebenenfalls quantifiziert.

Handelte es sich um ein präparatives Gel, so wurde die Bande mit Hilfe des UV-*shadowings* sichtbar gemacht und mit einem Stift markiert. Im Fall einer radioaktiven Markierung wurde eine Markierung mit einem radioaktiven Stift angebracht und das Gel autoradiographisch dokumentiert. Ein maßstabsgetreuer Ausdruck diente dann als Schablone



um die Bande von Interesse identifizieren zu können. Anschließend wurde sie ausgeschnitten und die Nukleinsäuren über Nacht in 1 M Natriumacetat (pH<4.9) bei 4°C unter Schütteln aus dem Gelstück eluiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die enthaltenen Nukleinsäuren ausgefällt (2.2.2.9 Fällung von Nukleinsäuren).

#### 2.2.2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bestimmt, indem die Absorption der entsprechenden Lösung in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt wurde. Im Fall einzelsträngiger DNA und RNA wurde eine Absorption von 1.0 bei 260 nm mit 40 µg/mL gleichgesetzt, wobei zusätzlich die Verdünnung in der Küvette zu berücksichtigen war. Bei doppelsträngiger DNA wurde aufgrund der Hypochromizität mit 50 µg/mL gerechnet.

#### 2.2.2.15 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäure-Lösungen verwendet. Dazu wurde die Probe zunächst mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 µL aufgefüllt, anschließend mit 500 µL Phenol (für RNA-Extraktionen Aqua-Phenol pH 4.5-5, für DNA-Extraktionen Phenol pH 7.5-8) versetzt, 1 min vortexiert und 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zwecks Phasentrennung zentrifugiert. Die (obere) wässrige Phase wurde ohne Mitnahme von Material aus der Interphase in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µL Chloroform versetzt. Es wurde erneut für 1 min vortexiert, 4 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µL Isopropanol und 50 µL 3 M Natriumacetat (pH < 4.9) und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur erfolgte die Fällung der RNA. Anschließend wurde 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µL Ethanol (75% v/v) vorsichtig gewaschen, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm. Der Ethanol-haltige Überstand wurde verworfen, das Pellet Luft-getrocknet und in einer angemessenen Menge ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 2.2.2.16 Plasmidpräparation

Plasmide wurden zur Vervielfältigung in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert (2.2.4.1 Transformation von Bakterien) und die Bakterien in einer Übernachtskultur vermehrt (2.2.4.2 Übernachtskultur). Das Volumen der Übernachtskultur orientierte sich am geplanten Maßstab der Präparation (3 mL Mini-, 30 mL Midi-, 300 mL Maxi-Präparation). Die nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden mit dem entsprechenden Plasmidpräparations-Kit (*Macherey-Nagel*; nach Herstellerangaben) behandelt. Die Reinheit der isolierten Plasmide wurde elektrophoretisch überprüft (2.2.2.12 Agarosegelelektrophorese) und ihre Konzentration bestimmt (2.2.2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren).

#### 2.2.3 Ribozymkinetische Untersuchungen

##### 2.2.3.1 RNA-allein-Reaktion

Bei erhöhten Konzentrationen bestimmter zweiwertiger Kationen (z.B. 100 mM Mg<sup>2+</sup>) ist die RNA-Komponente der bakteriellen RNase P trotz Abwesenheit der Protein-Komponente katalytisch aktiv. Ähnlich wie bei der Holoenzym-Assemblierung (2.2.3.2 Holoenzym-Assemblierung) sollte dabei von einer möglichst korrekt und einheitlich gefalteten RNA ausgegangen werden. Dazu wurde 10 nM RNase P RNA in 1×KN-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.2.3.2 Holoenzym-Assemblierung) für 5 min bei 85°C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösung auf 100 mM Mg<sup>2+</sup> eingestellt. Nach Aliquotierung wurden die RNA-Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das Volumen der Aliquots war abhängig von der Anzahl der später beabsichtigten Zeitwerte und wurde entsprechend angepasst (i.d.R. 24  $\mu$ L). Am Tag der Verwendung wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit dem zu testenden Inhibitor gemischt. Der Ribozym- und der Substratansatz wurden anschließend getrennt voneinander bei jeweils 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestartet, indem ein entsprechendes Volumen Substratansatz zum Ribozymansatz gegeben wurde. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen (i.d.R. 4  $\mu$ L) und mit bereits vorgelegtem eiskalten 2×PPF vermischt, um die Reaktion abzustoppen. Edukt und 5'-Spaltprodukt der Proben wurden anschließend auf einem denaturierenden 20%-PAA-Gel (2.2.2.13 PAA-Gelelektrophorese) voneinander getrennt und per Autoradiographie quantifiziert. Die Auswertung erfolgte wie beschrieben (2.2.3.4 Auswertung der Kinetiken).

Substratansatz:	100 nM Prä-tRNA <sup>Gly</sup>
	5'-markierte Prä-tRNA <sup>Gly</sup> (~5000 Cherenkov cpm)
	1×KN-Puffer
	ad ddH <sub>2</sub> O
	vor Mg <sup>2+</sup> -Zugabe ΔT:
	2 min 85°C, dann abkühlen auf 4°C
	anschließend Einstellung auf 100 mM Magnesiumacetat

### 2.2.3.2 Holoenzym-Assemblierung

Um die RNase P-Reaktion unter möglichst nativen Bedingungen zu untersuchen, wurden *in vitro* transkribierte RNase P RNA (2.2.2.10 *in vitro* Transkription) und heterolog exprimiertes RNase P Protein (2.2.1.1 Rekombinante Überexpression des RNase P Proteins aus *B. subtilis*) zum Holoenzym rekonstituiert. Vor der eigentlichen Assemblierung der beiden Komponenten war es notwendig, dafür zu sorgen, dass die RNA-Komponente möglichst homogen gefaltet vorliegt. Dazu wurde ein Rückfaltungsprotokoll durchgeführt. Zunächst wurden 10 nM RNase P RNA in 1×KN-Puffer bzw. 1×Reaktionspuffer 5 min bei 85°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf 4.5 mM Magnesiumacetat eingestellt. Für die Assemblierung des Holoenzym wurde das RNase P Protein (2.2.1.1 Rekombinante Überexpression des RNase P Proteins aus *B. subtilis*) hinzugefügt (Endkonzentration 20 nM) und der Ansatz erneut für 5 min bei 37°C inkubiert. Das resultierende Holoenzym wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5×KN-Puffer:	100 mM HEPES, pH 7.4
	750 mM Ammoniumacetat
	10 mM Spermidin
	0.25 mM Spermin
	20 mM 2-Mercaptoethanol
5×Reaktionspuffer:	100 mM MES, pH 6.5
	750 mM Ammoniumacetat
	5 % (v/v) DMSO

### 2.2.3.3 Holoenzym-Kinetik

Sämtliche kinetische Untersuchungen zur *B. subtilis* RNase P wurden mit präassembliertem Holoenzym (2.2.3.2 Holoenzym-Assemblierung) durchgeführt. Ein entsprechendes Aliquot wurde vor der Verwendung auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe eines zu untersuchenden Inhibitors erfolgte eine Präinkubation bei 37°C oder 50°C für 5 bis 30 min. Nach dem Starten der Reaktion durch Zugabe von Substratansatz wurden an festgelegten Zeitpunkten Aliquots (4 µL) entnommen, die mit vorgelegtem eiskalten 2×PPF vermischt wurden, um die Reaktion abzustoppen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Edukte und Produkte auf einem denaturierenden 20%igem PAA-Gel (2.2.2.13 PAA-Gelelektrophorese). Als Probe für den Zeitpunkt 0 s (Nullwert) wurde reiner Substratansatz verwendet. Die Banden der Prä-tRNA und des 5'-Spaltprodukts wurden quantifiziert und wie beschrieben ausgewertet (2.2.3.4 Auswertung der Kinetiken). Konkret wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

*Antisense*-Inhibition:        1 µL Inhibitor  
                                       7 µL Substratmix  
                                       24 µL präassembliertes Holoenzym

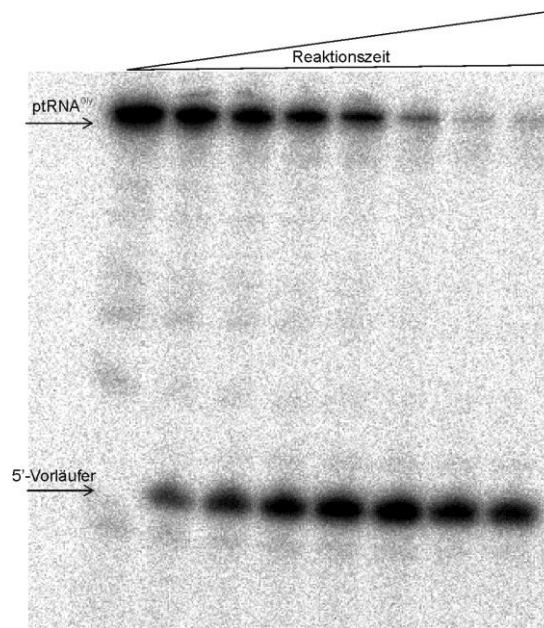
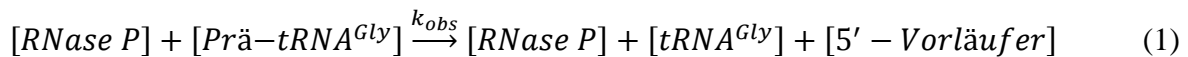
Aminoglykosid-Inhibitoren: 4 µL Inhibitor  
                                       8 µL Substratmix  
                                       20 µL präassembliertes Holoenzym

Heterozyklische Inhibitoren: 15 µL Inhibitor  
                                       5 µL Substratmix  
                                       10 µL präassembliertes Holoenzym

Substratansatz:                100 nM Prä-tRNA<sup>Gly</sup>  
                                       5'-markierte Prä-tRNA<sup>Gly</sup> (~5000 Cherenkov cpm)  
                                       1×KN-Puffer oder Reaktionspuffer  
                                       ad ddH<sub>2</sub>O  
                                       vor Mg<sup>2+</sup>-Zugabe ΔT:  
                                       2 min 85°C, dann abkühlen auf 4°C  
                                       anschließend Einstellung auf 4.5 mM Magnesiumacetat

### 2.2.3.4 Auswertung der Kinetiken

Die durchgeführten Kinetiken wurden wie beschrieben auf einem 20%igem denaturierenden PAA-Gel analysiert und die Banden per Autoradiographie visualisiert (2.2.3.1 RNA-allein-Reaktion, 2.2.3.3 Holoenzym-Kinetik, 2.2.2.13 PAA-Gelelektrophorese). Dies ermöglichte eine densitometrische Quantifizierung von Edukt (Prä-tRNA<sup>Gly</sup>) und des 5'-Spaltprodukts (die mature tRNA<sup>Gly</sup> blieb unsichtbar, da ihr die 5'-<sup>32</sup>P-Markierung fehlte), aus der berechnet werden konnte, welcher Anteil des Substrats beim jeweiligen Zeitwert prozessiert vorlag. Anschließend wurde der Substratumsatz gegen die Zeit auftragen und mittels nicht-linearer Regressionsanalyse die Ratenkonstante  $k_{obs}$  bestimmt, entsprechend dem folgenden vereinfachten kinetischen Modell:



**Abbildung 8:** Beispiel der per Autoradiographie visualisierten Prä-tRNA-Prozessierung. Man kann deutlich erkennen, dass mit fortschreitender Reaktionszeit der Anteil an Vorläufer-tRNA (Prä-tRNA<sup>Gly</sup>) abnimmt, während die Intensität der abgespaltenen 5'-Flanke zunimmt. Der 5'-Vorläufer ist am 5'-Ende radioaktiv markiert, daher ist die entstehende mature tRNA<sup>Gly</sup> hier nicht sichtbar.

Die jeweils obere Bande (Abbildung 8) stellt das Edukt, also die Prä-tRNA<sup>Gly</sup> dar, während die untere Bande die abgespaltene 5'-Flanke darstellt. Da die RNA am 5'-Ende radioaktiv markiert ist, bleibt die mature tRNA in der Autoradiographie unsichtbar. Die Summe aus beiden Banden (Prä-tRNA<sup>Gly</sup> und 5'-Flanke) repräsentiert also die Gesamtmenge an tRNA in der Probe (prozessiert und unprozessiert). Man kann also über den Quotienten

$\frac{[5'-Vorläufer]}{[5'-Vorläufer]+[Prä-tRNA^{Gly}]}$  den Anteil prozessierter tRNA errechnen und gegen die Reaktionszeit auftragen. Gemäß dem integrierten Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung (*single exponential*) kann man anschließend die Ratenkonstante  $k_{obs}$  bestimmen (für die Berechnung kam das Programm Grafit in der Version 5.0.13 zum Einsatz;  $f_{prozessiert}$  = Anteil prozessiert,  $f_{Endpunkt}$  = maximal prozessierbarer Anteil,  $t$  = Zeit).

$$f_{prozessiert} = f_{Endpunkt} \times (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (2)$$

Der auf diese Weise erhaltene  $k_{obs}$ -Wert musste bei Reaktionen unter *Multiturnover*-Bedingungen (MTO, E >>S) noch mit dem Faktor 10 multipliziert werden, da die MTO-Ansätze mit einem zehnfachen Substratüberschuss (gegenüber Enzym) durchgeführt wurden.

#### 2.2.3.5 Schnittstellenanalytik und *rescue*-Experimente

Am kürzlich entdeckten Enzym PRORP aus *A. thaliana* wurden Studien durchgeführt, um den katalytischen Reaktionsmechanismus näher zu beleuchten. Dabei lag der Fokus auf der Analyse der Schnittstellenposition (d.h. die Länge der abgespaltenen 5'-Flanke), um hier zwischen kanonischer Spaltung und Ausweichspaltung unterscheiden zu können.<sup>29,50</sup> Dafür wurden *single-turnover*-Experimente (E>>S) durchgeführt und die Prozessierungsansätze anschließend auf einem 25%igem denaturierenden PAA-Gel analysiert. Als Substrate wurden singulär modifizierte Varianten der Prä-tRNA<sup>Gly</sup> eingesetzt, die durch Ligation hergestellt wurden (2.2.2.7 Ligation von RNA). In diesem Zusammenhang wurden zudem die Effekte verschiedener thiophiler zweiwertiger Kationen getestet. Die zweiwertigen Kationen wurden jeweils frisch zugesetzt bzw. die Lösungen frisch angesetzt, um die Bildung unlöslicher Hydroxide (insbesondere im Fall von Cd<sup>2+</sup>) zu vermeiden. Als Größenreferenz wurden die beiden 5'-markierten Oligonukleotide 3034 (5'-CCC UUU-3') und 3035 (5'-CCC UUU dC-3'), die der Basensequenz der 5'-Flanke entsprechen, bzw. unmodifizierte ligierte Prä-tRNA verwendet.

Substratansatz:                    5'-markierte Prä-tRNA (~5000 Cherenkov cpm)  
    1×F-Puffer  
    10 mM Magnesiumacetat bzw.  
    9.5 mM Magnesiumacetat/12.5 µM Cadmiumacetat

PRORP-Ansatz:	225 nM PRORP3 1×F-Puffer 10 mM Magnesiumacetat bzw. 9.5 mM Magnesiumacetat/12.5 µM Cadmiumacetat
5×F-Puffer:	250 mM Tris-HCl, pH 7.0 100 mM NaCl 0.1 mg/mL BSA
EDB:	30 mM Tris-HCl, pH 7.8 30 mM NaCl 10% (v/v) Glycerol

## 2.2.4 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.4.1 Transformation von Bakterien

Plasmide wurden mit Hilfe der chemischen Transformation in Bakterienzellen transformiert. Dazu wurde 1 µL einer Verdünnung des entsprechenden Plasmides (ca. 100 ng) in 50 µL chemisch kompetente *E. coli*-Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42°C wurde sofort 950 µL antibiotikafreies LB-Medium hinzugegeben und 60 min bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einer LB-Agar-Platte mit den entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### 2.2.4.2 Übernachtskultur

Übernachtskulturen wurden sowohl im 3 mL- als auch im 25 mL-Maßstab verwendet. Dazu wurde das entsprechende Volumen an LB-Medium mit entsprechenden Selektionsmarkern versetzt (z.B. 100 µg/mL Ampicillin) und entweder mit einer Einzelkolonie oder mit einem Abstrich aus einer Bakterien-Glycerinkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 220 rpm.

### 2.2.4.3 Komplementationsexperimente

Komplementationsexperimente wurden durchgeführt, um zu testen, ob kleine organische Verbindungen in der Lage sind, über eine spezifische Hemmung der RNase P das Wachstum von Bakterien zu inhibieren. Für diese *in vivo* Experimente wurden *E. coli* BW-Zellen verwendet.<sup>52</sup> Darin ist die endogene RNase P RNA unter der Kontrolle eines Arabinose-Promotors, d.h. diese Bakterien können nur in Anwesenheit von Arabinose wachsen. Verwendet man dagegen Glukose statt Arabinose als Kohlenstoffquelle, so können *E. coli* BW-Zellen nur wachsen, wenn die endogene RNase P substituiert wird, beispielsweise über ein Plasmid, das die homologe RNase P RNA oder eine heterologe, in *E. coli* aktive RNase P (RNA) exprimiert. Um zu überprüfen, ob ein potenzieller Inhibitor spezifisch die bakterielle RNase P hemmt, wurde zum einen ein BW-Stamm verwendet, der die *E. coli* RNase P RNA (Gen *rnpB*) Arabinose-unabhängig von einem Plasmid exprimiert, sowie ein zweiter BW-Stamm, die die Kern-lokalisierte RNase P aus *A. thaliana* ebenfalls Plasmid-basiert exprimiert.<sup>8</sup> Dieses Enzym (PRORP3) besteht aus einem singulären Protein, das keinerlei Ähnlichkeit mit der bakteriellen RNase P besitzt und die Funktion der endogenen RNase P unter Glukose-Bedingungen übernehmen kann.

Für die Komplementationsexperimente wurde eine Übernachtskultur (3 mL LB-Medium, 10 mM Arabinose, 100 µg/mL Ampicillin, 34 µg/mL Chloramphenicol) mit einer Kolonie des jeweiligen *E. coli* BW-Stammes inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert (2.2.4.2 Übernachtskultur). Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und dreimal mit jeweils 1.4 mL eiskaltem und antibiotikafreiem LB-Medium gewaschen. Anschließend wurde das Pellet wieder in 1.4 mL eiskaltem LB-Medium resuspendiert und 1:1000 (in eiskaltem und antibiotikafreiem LB-Medium) verdünnt. Die resultierende Zellsuspension wurde zum Inokulieren der eigentlichen Komplementationsansätze verwendet. Dazu kamen Mikrotiterplatten (96-*well*- und 384-*well*-Format) oder LB-Agar-Platten zum Einsatz. Exemplarisch ist hier ein Ansatz für eine 384-*well*-Mikrotiterplatte spezifiziert:

70 µL LB-Medium (inkl. Selektionsmarker)

10 µL Inokulationskultur

0.8 µL der zu testenden Substanz in DMSO



Nach Komplettierung des Ansatzes wurde die Platte über Nacht bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte (600 nm) gemessen, um eine Wachstumsinhibition feststellen zu können.

#### 2.2.4.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

300 mL LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur (3 mL) (2.2.4.2 Übernachtskultur) inokuliert und bei 37°C und 180 rpm 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 30 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 mL eiskaltem CaCl<sub>2</sub> (100 mM) resuspendiert. Nachdem 25 min auf Eis inkubiert wurde, wurde erneut bei 4°C und 4000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 7 mL eiskaltem CaCl<sub>2</sub>/Glycerin-Gemisch (75 mM CaCl<sub>2</sub>; 25% v/v Glycerin) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension aliquotiert (50 µL) und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

In einem alternativen Ansatz wurde mit einer Übernachtskultur 1:100 eine frische Kultur angeimpft und diese bis zu einer OD von ca. 0.5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (3000 rpm, 10 min) und der Überstand verworfen. Das resultierende Pellet wurden in 10% (v/v) des Ausgangsvolumens in TSS-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte in beiden Verfahren bei -80°C.

TSS-Puffer:	10% (w/v) PEG 4000
	30 mM MgCl <sub>2</sub>
	5% (v/v) DMSO
	ad. LB-Medium

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Strategien zur Inhibition der RNase P aus *B. subtilis*

##### 3.1.1 Antisense-Oligonukleotide

Die Ergebnisse dieses Teils der vorliegenden Arbeit sind im Rahmen eines Manuskripts nachfolgend dargestellt (*Bacterial type B RNase P - functional characterization of the L5.1-L15.1 tertiary contact and antisense inhibition; RNA (2016) accepted*). Darin wird demonstriert, dass der L5.1-L15.1 Intradomänen-Kontakt in der katalytischen Domäne der Typ B RNase P von *Bacillus subtilis* für das Einnehmen einer kompakten funktionellen Konformation entscheidend ist: Eine Unterbrechung des L5.1-L15.1-Kontaktes durch Antisense-Oligonukleotide oder durch Mutation reduzierte sowohl *in vitro* die P RNA-allein- als auch die Holoenzymaktivität um ein bis zwei Größenordnungen, retardierte die Gelmobilität der RNA, affektierte die Struktur der Regionen P7/P8/P10.1, P15 und L15.2 und hob die Fähigkeit der *B. subtilis* P RNA einen P RNA-defizienten *Escherichia coli*-Stamm zu komplementieren auf. Wir konnten außerdem durch Mutationsexperimente zeigen, dass ein L9-P1 Tertiärkontakt, wie in einigen *Mycoplasma* Typ B RNAs gefunden, nicht in kanonischen Typ B RNAs, wie sie durch die *B. subtilis* P RNA repräsentiert werden, gebildet wird. Schließlich konnten wir die P5.1 und P15 *stem-loop*-Struktur als Ziele für LNA-modifizierte Antisense-Oligonukleotide explorieren. Oligonukleotide die an P15 binden (allerdings nicht diejenigen die an P5.1 binden), stellten sich als effiziente P RNA-Binder heraus und inhibierten die RNase P-Aktivität signifikant ( $IC_{50} \sim 2$  nM), wenn sie mit präassemblierten *B. subtilis* RNase P-Holoenzym inkubiert wurden.

**Bacterial type B RNase P - functional characterization of the L5.1-L15.1 tertiary contact and antisense inhibition**

Dennis Walczyk<sup>1,&</sup>, Dagmar K. Willkomm<sup>2,&</sup>, Roland K. Hartmann<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg,  
Marbacher Weg 6, D-35037 Marburg, Germany, e-mail: roland.hartmann@staff.uni-marburg.de

<sup>2</sup> Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus  
Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

& Both authors contributed equally to the presented work

\* Correspondence to: roland.hartmann@staff.uni-marburg.de

*Running title:* L5.1-L15.1 contact in *B. subtilis* P RNA

*Keywords:* *B. subtilis* P RNA, mutation of L5.1-L15.1 contact, structure probing, kinetics, antisense inhibition

## Abstract

Ribonuclease P is the ubiquitous endonuclease that generates the mature 5'-ends of precursor tRNAs. In Bacteria, the enzyme is composed of a catalytic RNA (~ 400 nt) and a small essential protein subunit (~13 kDa). Most bacterial RNase P RNAs (P RNAs) belong to the architectural type A; type B RNase P RNA is confined to the low-G+C Gram-positive bacteria. Here we demonstrate that the L5.1-L15.1 intradomain contact in the catalytic domain of the prototypic type B RNase P RNA of *Bacillus subtilis* is crucial for adopting a compact functional conformation: disruption of the L5.1-L15.1 contact by antisense oligonucleotides or mutation reduced P RNA-alone and holoenzyme activity by one to two orders of magnitude *in vitro*, largely retarded gel mobility of the RNA and further affected the structure of regions P7/P8/P10.1, P15 and L15.2, and abolished the ability of *B. subtilis* P RNA to complement a P RNA-deficient *Escherichia coli* strain. We also provide mutational evidence that an L9-P1 tertiary contact, as found in some *Mycoplasma* type B RNAs, is not formed in canonical type B RNAs as represented by *B. subtilis* P RNA. We finally explored the P5.1 and P15 stem-loop structures as targets for LNA-modified antisense oligonucleotides. Oligonucleotides targeting P15, but not those directed against P5.1, were found to efficiently anneal to P RNA and to inhibit activity (IC<sub>50</sub> of ~ 2 nM) when incubated with preassembled *B. subtilis* RNase P holoenzymes.

## Introduction

RNase P endonucleolytically removes 5'-leader sequences from precursor tRNAs in all domains of life to generate functional tRNAs (Frank and Pace, 1998; Lai et al 2010; Lechner et al. 2015). In bacteria, the RNase P holoenzyme consists of an RNA subunit of up to 400 nt in length and a small basic protein of ~13 kDa. The bacterial RNA subunit displays robust RNA-alone catalytic activity *in vitro*, but the protein component is indispensable for enzyme function *in vivo* (Schedl et al. 1974; Kirsebom et al. 1988; Gößringer et al. 2006; see Gößringer and Hartmann, 2007 for review). Archaeal and many eukaryotic nuclear RNase P enzymes are ribonucleoprotein (RNP) enzymes as well, but their RNA subunits have lost robust RNA-alone activity (Pannucci et al. 1999; Kikovska et al. 2007; Li et al., 2009 and 2011), they depend on more protein subunits (at least 4 in Archaea, 9-10 in Eukarya), and none of the archaeal/eukaryal proteins is related to the bacterial RNase P protein (for review, see Hartmann et al. 2009; Ellis and Brown 2010; Jarrous and Gopalan 2010; Lai et al. 2010; Walker et al. 2010; Lechner et al. 2015). Finally, the mammalian mitochondrial RNase P lacks any RNA subunit (Holzmann et al. 2008).

Numerous studies in the bacterial RNase P field contributed novel insights into our general understanding of RNA architecture and structure formation. Milestones included, to name but a few, the finding that RNase P RNAs (P RNAs) consist of two independently folding domains, the specificity (S-) domain and the catalytic (C-) domain (Loria and Pan 1996), the bioinformatic derivation of P RNA 3D architecture (Massire et al., 1998) and the crystal structures of P RNA domains (Krasilnikov et al. 2003, 2004), full-length P RNAs (Kazantsev et al. 2005; Torres-Larios et al. 2005) and a type A RNase P holoenzyme-tRNA complex (Reiter et al. 2010). There are two architectural types of bacterial P RNA, type A and B (Haas et al. 1996), which differ in peripheral structural elements but have very similar S- and C-domain core structures. However, based on 3D structural analyses, type A RNAs adopt more concave folds (owing to stabilizing interdomain contacts, see below) capable of forming the S-domain:T-loop interaction, while the rather flat type B RNA structures need to

undergo a conformational change to form the S-domain:T-loop contact (Kazantsev et al. 2011).

In P RNAs of type A, three interdomain loop–helix contacts are known to orient C- and S-domains toward each other: L18–P8, L8–P4, and P1–L9 (Brown et al. 1996; Massire et al. 1997, 1998). While the L8-P4 contact is universally conserved among bacterial P RNAs, the L18–P8 interaction is present in the majority but not all type A RNAs, and the P1–L9 contact is mainly implemented in thermostable P RNAs of type A (Marszalkowski et al. 2008). Interestingly, two P RNAs from *Aquificales* with growth optima of ~70°C that lack P18 form instead a stable L9-P1 contact consisting of a 5'-GYAA L9 tetraloop docking onto tandem G-C base pairs in P1 (Marszalkowski et al., 2006). The same type of L9-P1 contact likely compensates the lack of P18, and thus absence of the L18-P8 contact, in P RNAs from *Chlorobium* species (Haas et al., 1994). Thus, it seems that usually two interdomain contacts are implemented in bacterial type A RNAs, sometimes three in thermostable P RNAs such as the one from *Thermus thermophilus* (Marszalkowski et al., 2008).

In P RNAs of type B, C- and S-domain primarily interact via the conserved L8-P4 contact (Massire et al. 1998; Kazantsev et al. 2005). Regarding P1-L9, it is yet unclear if such contact forms in type B RNA, as the crystal structure of the related *Geobacillus stearothermophilus* P RNA lacked electron density in the P9 region (Kazantsev et al. 2005). At least a subset of type B RNase P RNAs from *Mycoplasma* species form a pseudoknot (P21) between an enlarged L9 loop and a single-stranded 3'-extension of P1 (Massire et al. 1997). Within P RNA C-domains, hallmarks are the L5.1-L15.1 contact specific for type B and the pseudoknotted P6 helix specific for type A RNAs (Massire et al. 1998).

Several features also make bacterial RNase P an attractive drug target: (i) the enzyme is essential for viability; (ii) there are fundamental architectural differences between bacterial RNase P and that of eukaryotes; and (iii) at a 60 to 100-fold lower copy number in the cell than ribosomes, the number of RNase P molecules to be targeted per cell is comparatively low (Dong et al. 1996). Thus, several studies have so far explored the druggability of bacterial RNase P using different classes of small molecules (Vioque, 1989;

Mikkelsen et al. 1999; Eubank et al. 2002; Hori et al. 2005; Kawamoto et al., 2008; Toumpeki et al. 2008; Liu et al. 2014; reviewed in Willkomm et al. 2010). Finally, as the enzyme mostly consists of RNA, bacterial RNase P lends itself to being addressed by antisense agents. We and others have previously explored antisense inhibition of the type A RNase P RNA from *Escherichia coli*, which identified the L15/16 loop that interacts with tRNA 3' CCA ends as the most effective target site within the ribozyme (Willkomm et al. 2003; Childs et al. 2003; Gruegelsiepe et al. 2003, 2006). Noteworthy, conjugates of an invasive peptide and a peptide nucleic acid (PNA) 14-mer targeting the L15/16 loop showed P RNA-specific growth inhibition of *E. coli* cells (Gruegelsiepe et al. 2006).

Up to now, antisense approaches focused on type A RNase P RNA of *E. coli* only. However, a number of highly relevant pathogens (e.g. *Staphylococcus aureus*, *B. anthracis*, *Mycoplasma* species) possess type B RNase P RNAs. Therefore, in the present study, we performed experiments to target *B. subtilis* P RNA as the major model system of type B architecture, although substantial functional and structural studies were also performed with the P RNA from *Mycoplasma hyopneumoniae* (Svård et al. 1994, 1996; Brännvall et al. 1998; Brännvall and Kirsebom 2005). We started out with disrupting the tertiary contact between elements L5.1 and L15.1 either via antisense oligonucleotides targeting the L5.1 loop or by mutation, which allowed us to demonstrate the crucial role of this type B-specific interaction for enzyme function *in vitro* and *in vivo*. We further compared the L5.1 target region with the L15 loop interacting with tRNA 3'-CCA ends (Svård et al. 1996; Wegscheid and Hartmann 2007) in terms of inhibitory antisense efficacy. Whereas a 14-meric LNA/DNA-mixmer was shown to efficiently target the L15 loop to inhibit activity of *B. subtilis* RNase P, preassembled holoenzymes were not accessible to invasion and inactivation by even longer LNA-modified oligonucleotides (20 to 21-mers) targeting the L5.1 region. Finally, we could rule out an L9-P1 interdomain contact in *B. subtilis* RNase P, whose formation had remained unclear owing to the lack of electron density in P9 in the X-ray structure of the related *Geobacillus stearothermophilus* P RNA (Kazantsev et al. 2005).

## RESULTS

### *Targeting P5.1 of B. subtilis P RNA by antisense oligonucleotides*

In an exploratory SELEX procedure to screen for regions in *B. subtilis* P RNA that are accessible to the binding of antisense oligonucleotides (see Supplementary material; Fig. S1 and S2), we identified RNA oligonucleotides complementary to sequences in the P5.1 region (AS1-long and AS2-long), complementary to nt 58-77 and nt 52-72 of *B. subtilis* P RNA, respectively; see Fig. 1 A). As these oligonucleotides would disrupt the L5.1-L15.1 tertiary contact in the C-domain of type B RNase P RNAs (Kazantsev et al. 2005), we decided to analyze this target region in detail. First we addressed the question if the two selected antisense RNAs (AS1-long and AS2-long) targeting the P5.1 region by 20 or 21 complementary nucleotides were able to inhibit the RNase P reaction. Both oligonucleotides showed inhibitory effects in the RNA-alone reaction (Fig. 1 B). As the antisense transcripts contained additional 5'- and 3'-flanking sequences deriving from the SELEX procedure (see Supplementary material), we also included a synthetic derivative of library RNA AS1-long that only contained the 20 nt fully complementary to *B. subtilis* RNase P RNA (named AS1). RNA oligonucleotide AS1 was a more effective inhibitor than the parental library RNA AS1-long, suggesting that the additional 5'- and 3'-flanking sequences negatively affected the efficacy of oligonucleotide annealing. At varying concentrations, RNA oligonucleotide AS1 inhibited RNase P cleavage with an  $IC_{50}$  of  $48 \pm 9$  nM in the RNA-alone reaction and  $89 \pm 51$  nM in holoenzyme assay I (Fig. S3).

### *Disrupting the L5.1-L15.1 interaction – effect on P RNA folding*

As RNA antisense oligonucleotides AS1-long and AS2-long were identified in a gel mobility shift-based selection approach (Fig. S2), we considered it likely that binding of these RNAs to *B. subtilis* P RNA, which would disrupt the L5.1-L15.1 long-range interaction (Kazantsev et al. 2005), leads to substantial conformational changes and thus strongly altered gel mobility.



To examine this idea we further constructed a *B. subtilis* P RNA variant with disrupted L5.1-L15.1 contact owing to truncation of the apical part of L15.1 (named P RNA mutant  $\Delta$ 15.1, Fig. 2 A). The truncation removed the conserved A residues 280, 281, 285 and 286 (Massire et al. 1998) that are crucial for the L5.1-L15.1 interaction (Kazantsev et al. 2005). The shortened stem was closed by a stable 5'-UUCG tetraloop.

Indeed, preannealing of oligonucleotide AS1 to wild-type (wt) P RNA resulted in a substantial retardation of gel mobility (Fig. 2 B, lanes 2-4). P RNA variant  $\Delta$ 15.1 already migrated markedly slower than the wt RNA in the absence of AS1 (Fig. 2 B, lane 5 vs. 1); preannealing of AS1 reduced gel mobility only slightly further (Fig. 2 B, lanes 6-8). These findings indicate the fundamental importance of the L5.1-L15.1 contact for the overall folding of bacterial type B RNase P RNAs.

The effects of disrupting the L5.1-L15.1 contact were also analyzed by RNase T1 probing (Fig. 2C, D). This revealed increased accessibility of L5.1 in the  $\Delta$ 15.1 mutant (Fig. 2 C, G70/72, lanes 5 vs. 4), in line with disruption of the loop-loop interaction, and confirmed binding of AS1 as predicted. Also, AS1 increased the accessibility of the region 3' of its binding site (P8/P9/P10.1, Fig. 2 A bottom; Fig. 2 C, lane 7 vs. 8) and affected the P15 region: accessibility of G258/9 decreased and that of G262-265 increased (Fig. 2 D, lane 13 vs. lanes 12 and 14), a trend that was also weakly but reproducibly seen for the  $\Delta$ 15.1 mutant (Fig. 2 D, lane 15 vs. 12 and 14). Finally, AS1 and, to a lesser extent, the  $\Delta$ 15.1 mutation decreased accessibility of G305 in the L15.2 loop (Fig. 2 D, lanes 12-15). In summary, disruption of the L5.1-L15.1 interaction by annealing of oligonucleotide AS1 altered the accessibility of regions P8/P9/P10.1, P15 and L15.2 to cleavage by RNase T1. Disruption of the interaction by the  $\Delta$ 15.1 mutation confirmed such effect for L15.2 (and to a smaller extent for L15) and, as expected, showed increased accessibility also for L5.1.

*Kinetic analysis of the P RNA mutants  $\Delta 15.1$ , mL9 and P9Mf*

In addition to analyzing the effect of disrupting the L5.1-L15.1 contact on enzyme activity, we were interested in exploring the possible formation of an L9-P1 tertiary contact. In the X-ray structure of the related *G. stearothermophilus* P RNA, the apical part of P9 remained unresolved (Kazantsev et al. 2005), but P1 and P9 are juxtaposed and may well interact with each other. To test this we constructed two P9 mutants of *B. subtilis* P RNA, variants mL9 and P9Mf (Fig. 3 A). In variant mL9, the L9 tetraloop was mutated from 5'-UUAG to 5'-GUUU (to disrupt a potential tetraloop sequence-specific interaction), whereas P9 was largely truncated in variant P9Mf by changing it to the P9 element found in P RNAs from *Mycoplasma fermentans* and *M. flocculare* (Massire et al. 1997).

We determined the single turnover kinetic parameters of the RNA-alone reaction ( $k_{\text{react}}$  and  $K_{\text{m(sto)}}$ ) for *B. subtilis* P RNAs  $\Delta 15.1$ , mL9 and P9Mf relative to the wt RNA (Table 1; Fig. 3 B). This revealed essentially no effect of the mL9 mutation, little effect of the P9Mf mutation (less than twofold reduction in  $k_{\text{react}} / K_{\text{m(sto)}}$ ), but severe defects particularly on the level of  $k_{\text{react}}$  in the presence of the  $\Delta 15.1$  mutation ( $k_{\text{react}} / K_{\text{m(sto)}}$  decreased by almost two orders of magnitude; Table 1). Similarly, the velocity of the holoenzyme reaction was essentially identical for wt P RNA and variants mL9 and P9Mf, but dropped more than tenfold in the case of variant  $\Delta 15.1$  (Table 2).

*In vivo complementation of the B. subtilis  $\Delta 15.1$  mutant P RNA in E. coli BW*

Expression of the *rnpB* gene (encoding the RNase P RNA subunit) in *E. coli* strain BW strictly depends on the presence of arabinose in the growth medium (Wegscheid and Hartmann, 2006). In the presence of glucose instead of arabinose as carbon source, chromosomal *rnpB* expression is switched off in strain BW and further growth requires (plasmid-based) expression of another gene that provides the RNase P function. Expression

of *B. subtilis* wt *rnpB* from plasmid pACYC indeed supported growth of *E. coli* BW bacteria, although less efficiently than the homologous *E. coli* *rnpB* gene (Fig. 4; see the more cauliflower-like appearance of colonies in the north-east segment of the glucose plate). However, no complementation was observed with the *B. subtilis*  $\Delta$ 15.1 *rnpB* gene (Fig. 4). This *in vivo* result confirms the *in vitro* data, indicating that disruption of the L5.1-L15.1 tertiary contact largely prevents type B RNase P RNAs from adopting an active conformation.

#### *Inhibition assays with LNA/RNA(DNA) mixmers*

In our initial inhibition assay (holoenzyme assay I, Fig. S3) we preincubated P RNA with the RNA antisense oligonucleotide at 55°C before adding the P protein, which favored oligonucleotide invasion and annealing. We also tested oligonucleotide inhibition in a setup where we preassembled the RNase P holoenzyme before preincubating holoenzyme and the inhibitory oligonucleotide (holoenzyme assay II). This setup was used in view of applications closer to the natural situation (where inhibitors primarily act on assembled holoenzymes), e.g. where one wants to inhibit endogenous RNase P activities in cell lysates in the context of RNA processing studies. Under these conditions, we did not observe any significant inhibition by RNA oligonucleotide AS1 at a concentration of 10  $\mu$ M, irrespective of the length (5 to 30 min) and temperature (37 or 50°C) of holoenzyme/inhibitor preincubation before addition of pre-tRNA (Fig. 5 B, C). To enhance inhibition efficacy, we then tested an LNA/RNA mixmer version of AS1 (named AS1-LNA) and another LNA/RNA mixmer with the target site on P RNA shifted by 7 nt and 1 nt longer than AS1 (named AS3-LNA). AS1-LNA showed enhanced inhibition in the 50°C preincubation setup only (relative to AS1), while AS3-LNA failed to substantially improve efficacy (Fig. 5 B, C). To further enhance inhibition efficacy we considered the L15 loop as a target site, based on its exposition on the surface for Watson-Crick binding with pre-tRNA 3'-CCA ends (Sv rd et al. 1996; Wegscheid and Hartmann, 2007) and the suitability of the corresponding region in type A RNAs for antisense inhibition (Gruegelsiepe et al. 2003, 2006; Willkomm et al., 2003). The 14-meric LNA/DNA

mixmer AS4-LNA (directed against nt 251-264 of P15) indeed turned out to be an efficient inhibitor of the *B. subtilis* RNase P holoenzyme, strongly inhibiting enzyme activity in the 37°C and 50°C preincubation setup and after preincubation periods as short as 5 min (Fig. 5 B, C), with an IC<sub>50</sub> of ~ 2 nM (holoenzyme/inhibitor preincubation for 15 min at 37°C; Fig. 6).

## DISCUSSION

Disrupting the L5.1-15.1 tertiary contact of *B. subtilis* P RNA by an antisense RNA oligonucleotide annealing to the P5.1/P5 region or by deleting the apical part of L15.1 substantially reduced the RNA's three-dimensional compactness, as inferred from largely retarded mobility in native PAA gels. The change in gel mobility relative to native P RNA was particularly pronounced upon annealing of the antisense RNA 20-mer, explaining why we identified this type of antisense oligonucleotides in a SELEX assay selecting for antisense RNAs that retard P RNA gel mobility. RNase T1 probing indicated that disruption of the L5.1-15.1 interaction also affects folding of the nearby P15 element, known to interact with tRNA 3'-CCA ends (Fig. 2 and 7). The sensitivity of the L15 loop to changes induced by structural alterations in its vicinity may be explained by its high flexibility, inferred from the finding that it remained unresolved in the *G. stearothermophilus* P RNA crystal structure (Kazantsev et al. 2005). Altered susceptibility at G305 in the L15.2 loop upon L5.1-15.1 disruption was surprising, as P15.2 sticks out of the molecule and points to the opposite direction relative to P15.1 (Fig. 7). This may reflect a more indirect effect resulting from altered interaction modes of P RNA and the relatively bulky RNase T1 probe upon disruption of the L5.1-15.1 tertiary contact. However, one should mention that the genuine positioning of P15.2 is not yet clear, since the L15.2 loop was involved in the formation of crystal contacts (Kazantsev et al. 2005). Oligonucleotide invasion into P5.1/P5 further seemed to destabilize folding of elements P7/P8/P10.1, as inferred from increased susceptibility to hydrolysis by RNase T1 (Fig. 2).

Combined with the kinetic data and *in vivo* complementation results obtained for the P RNA variant  $\Delta 15.1$ , our findings demonstrate that the L5.1-15.1 intra-C-domain contact is a key strut of the type B structure, required for locking the RNA in its active conformation, which likely also positions the neighboring L15 in a manner favorable for base-pairing with pre-tRNA 3'-CCA ends. Architecturally, the L5.1-15.1 intra-C-domain contact is likely at least as crucial as the universally conserved L8-P4 interdomain contact, as the L5.1-15.1 contact is a lateral clamp with optimal leverage effect, apparently well placed to effectively stabilize the rather flat array of helical domains in type B catalytic RNAs (Kazantsev et al. 2005; Fig. 7).

Both the L5.1-15.1 and L8-P4 contacts were found to be surprisingly complex in the crystal structure of *G. stearothermophilus* P RNA (Kazantsev et al. 2005). This complexity of the L5.1-15.1 interaction may explain its relative inaccessibility to oligonucleotide invasion in the context of the fully assembled holoenzyme (Fig. 5). Our study further excludes formation of a specific L9-P1 tertiary contact that may significantly contribute to interdomain orientation and catalytic function in normal type B RNase P RNAs. Only some *Mycoplasma* type B RNase P RNAs have developed a tertiary contact between L9 and P1, in this case a pseudoknot interaction (P21; see above). Why some *Mycoplasma* species (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*) have this stabilizing L9-P1 contact which is lacking in others remains to be addressed experimentally.

The 20-meric RNA oligonucleotide AS1, a derivative of the selected library RNA AS1-long, was only weakly inhibitory in assays using preassembled RNase P holoenzyme. To improve oligonucleotide affinity and thus inhibition efficacy, we designed two RNA/LNA mixmers (AS1-LNA and AS3-LNA) that differed from each other by somewhat shifted target sites. Both mixmers did not substantially improve the efficacy of inhibition when preincubated with the RNase P holoenzyme at 37°C. Increasing the temperature for preincubation of holoenzyme and oligonucleotide to 50°C to enhance flexibility of the P RNA structure and facilitate oligonucleotide invasion, marginally enhanced inhibition by AS3-LNA and moderately by AS1-LNA. Temperatures above 50°C were not used to avoid disassembly of

the holoenzyme. However, a 14-meric LNA/DNA mixmer (AS4-LNA) directed against the P15 element turned out to be a very efficient inhibitor of the *B. subtilis* RNase P holoenzyme, in line with exposure of the L15 loop on the RNA's surface for base-pairing with tRNA 3'-CCA ends. The AS4-LNA inhibitor may be useful to block the endogenous RNase P activity in cell lysates used for RNA processing studies employing exogenously added RNases. For example, *B. subtilis* cells grown under heat shock conditions (e.g. 50°C) may accumulate RNA precursors for which processing may subsequently be analyzed in cell lysates after silencing of endogenous RNase P activity.

Our finding that the L15 loop is an excellent target site for antisense strategies not only in bacterial type A RNase P RNAs (Childs et al. 2003; Gruegelsiepe et al. 2003, 2006; Willkomm et al. 2003), but also in type B RNAs (this study), allows one to conclude that this region is generally predestined for antisense inhibition strategies, thus obviating the need for experimental approaches to screen for accessible regions in other bacterial P RNAs. Furthermore, in addition to sterically interfering with substrate (3'-CCA) binding, the inhibitory efficacy of antisense oligonucleotides targeting the L15 loop of *E. coli* (type A) RNase P RNAs was inferred to include contributions from partially unfolding the catalytic core and from perturbing the coordination of catalytically relevant  $Mg^{2+}$  ions (Gruegelsiepe et al. 2006). It will be interesting to explore to which extent this mechanistically applies to bacterial type B RNase P enzymes as well. Finally, peptide nucleic acid (PNA) versions of the AS4 oligonucleotide coupled to invasive peptides are promising candidates for *in vivo* growth inhibition of *B. subtilis*, as demonstrated for PNA-peptide conjugates targeting the functionally equivalent L15 loop region of *E. coli* RNase P RNA (Gruegelsiepe et al. 2006). Even further, the L15 loop due to both accessibility and key role in RNase P function lends itself to be explored as a potentially vulnerable target site also for RNase P inhibitors of other chemical nature for which an *in vivo* application might be more feasible than for antisense oligonucleotide-based strategies.

## MATERIALS AND METHODS

### Synthetic oligonucleotides

The RNA oligonucleotide AS1 (5'-GGC AUC UCA GCA CCG UGC GA-3'; targeting nt 58-77 of *B. subtilis* P RNA), lacking the constant 5'- and 3'-extensions of the SELEX library transcripts (see Supplementary material), was obtained from Integrated DNA Technologies (IDT). LNA/RNA mixmers AS1-LNA (5'-GGC AUC UCA GCA CCG UGC **GA**-3'; as AS1, but with locked nucleic acid [LNA] modifications indicated in bold) and AS3-LNA (5'-**ACA** CUA CGG GCA UCU CAG **CAC**-3', targeting nt 85-65 of *B. subtilis* P RNA, LNA modifications indicated in bold), as well as the LNA/DNA mixmer AS4-LNA (5'-**CCC TAC CAA AAT TT**-3', targeting nt 264-251 of *B. subtilis* P RNA, LNA modifications indicated in bold). were purchased from Exiqon.

### Construction of mutant P RNAs

Mutant P RNAs were constructed using standard PCR techniques as described (Li et al. 2009) and verified by DNA dideoxy sequencing (custom service by Eurofins Genomics).

### Inhibition assays

All inhibition assays were performed under multiple turnover conditions (10 nM P RNA and 100 nM pre-tRNA substrate). Preincubation of pre-tRNAs in RNA-alone reactions was for 5 min at 55°C and for 25 min at 37°C; P RNAs with inhibitor were preincubated for 40 min at 37°C in reaction buffer (100 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 100 mM NH<sub>4</sub>OAc and 50 mM HEPES, pH 7.0). RNase P holoenzyme reactions were performed in buffer KN (200 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NH<sub>4</sub>OAc, 2 mM spermidine, 0.05 mM spermine, 4 mM β-mercaptoethanol) and 4.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>.

For holoenzyme assay I, P RNA and inhibitor were preincubated for 5 min at 55°C followed by 50 min at 37°C. Then RNase P protein was added, followed by another 5 min at 37°C. Pre-tRNAs were preincubated for 5 min at 55°C and for 25 min at 37°C.

For holoenzyme assay II, preassembled holoenzyme was used and preincubated with inhibitor for 5 to 30 min at 37°C or 50°C. Pre-tRNA was incubated at 85°C for 2 min in KN buffer without  $\text{Mg}^{2+}$ , then chilled on ice, followed by adding  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  to a final concentration of 4.5 mM. Holoenzyme assembly was carried out as follows: 10 nM *B. subtilis* P RNA was incubated in KN buffer for 1 min at 85°C and cooled down to room temperature within 1 h. Samples were then adjusted to 4.5 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  and incubated for 5 min at 37°C. Holoenzyme formation was induced by addition of *B. subtilis* P protein (20 nM final concentration), followed by incubation for 10 min at 37°C. Holoenzyme aliquots were frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C and used up (leftovers discarded) after the first thawing. For the number of individual experiments and experimental errors, see figure and table legends.

### ***In vitro* transcription, $^{32}\text{P}$ -labeling and structure probing with RNase T1**

*B. subtilis* P RNA variants and pre-tRNA<sup>Gly</sup> (from *T. thermophilus*) were produced by runoff *in vitro* transcription using plasmids pDW66 (linearized with *Dra*I; Warnecke et al., 1999) and pSBpt3'hh (linearized with *Bam*HI; Busch et al. 2000), respectively, as previously described (Gruegelsiepe et al. 2005). 5'-endlabeling of pre-tRNA and 5'- and 3'-endlabeling of P RNAs was done as described (Gimple and Schön, 2014). Enzymatic probing with RNase T1 was performed according to (Li et al. 2009). For the synthesis of partially Rp-phosphorothioate-modified P RNAs and generation of phosphorothioate-specific iodine hydrolysis ladders, see Heide et al. (2001).

### **Native PAGE analysis**

Native PAGE analysis of *B. subtilis* wt P RNA and the  $\Delta 15.1$  mutant with and without preannealed oligonucleotide AS1 was performed as follows: 20,000 cpm of 3'- $^{32}\text{P}$ -labeled P RNA plus 50 fmol AS1, were preincubated in buffer KN containing 4.5 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  for 5 min at 55°C plus 50 min at 37°C, followed by mixing with an equal volume of native gel loading buffer (10% glycerol, 0.025% each xylene cyanol and bromophenol blue, 10 mM



MgCl<sub>2</sub>) and native 11.25% polyacrylamide gel electrophoresis in THEAM buffer (66 mM HEPES, 33 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NH<sub>4</sub>OAc and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4).

### Preparation of recombinant RNase P protein

Recombinant RNase P protein used for holoenzyme assay I was prepared as described (Marszalkowski et al. 2006), and for holoenzyme assay II according to (Niranjanakumari et al. 1998).

### Single turnover RNA-alone kinetics of *B. subtilis* P RNA variants

Reactions were carried out in 50 mM MES, 100 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 100 mM NH<sub>4</sub>OAc, 0.1 mM EDTA, pH 6.0 using trace amounts (< 1 nM) of 5'-<sup>32</sup>P-endlabeled ptRNA<sup>Gly</sup> (the 3'-CCA terminus extended by the trinucleotide GUC) and varying excess amounts of the respective *B. subtilis* P RNA variant. Substrate and P RNA were preincubated separately in the same buffer for 5 min at 55°C and 55 min at 37°C before mixing the two to start the kinetics at 37°C. Aliquots were withdrawn at different time points, reactions stopped by addition of denaturing loading buffer, and samples analyzed by 20% denaturing PAGE. The single turnover kinetic parameters  $k_{\text{react}}$  and  $K_{\text{m(sto)}}$  shown in Table 1 were determined as described (Busch et al. 2000). For the number of individual experiments and experimental errors, see figure and table legends.

### Holoenzyme kinetics of *B. subtilis* P RNA variants

Reactions were performed with holoenzyme preassembled from 10 nM RNase P RNA and 100 nM *B. subtilis* RNase P protein using 100 nM 5'-<sup>32</sup>P-endlabeled ptRNA<sup>Gly</sup> in buffer KN4.5 (20 mM HEPES pH 7.4 [37°C], 150 mM NH<sub>4</sub>OAc, 2 mM spermidine, 0.05 mM spermine, 4 mM β-mercaptoethanol, 4.5 mM Mg[OAc]<sub>2</sub>) at 37°C. For the number of individual experiments and experimental errors, see figure and table legends.

### **In vivo complementation analysis**

The *E. coli* BW strain carries the chromosomal *rnpB* gene under control of the arabinose-dependent  $P_{BAD}$  promoter (Wegscheid and Hartmann, 2006). Bacteria were chemically transformed with the low copy vector pACYC encoding the respective *rnpB* structural gene under control of the native *E. coli* *rnpB* promoter. For complementation experiments a single colony was resuspended in 500  $\mu$ l LB medium. A droplet of 10  $\mu$ L was applied to an LB agar plate containing 100  $\mu$ g/mL ampicillin, 34  $\mu$ g/mL chloramphenicol and 10 mM arabinose or glucose. Plates were incubated for 2 days at 37°C.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We like to acknowledge Heike Wünnenberg, Martin Lützelberger, Jørgen Kjems and Ina Hagedorn for their experimental and technical contributions to the SELEX experiments, and Ina Hagedorn also for contributing to the initial kinetic experiments. We thank the German Research Foundation (DFG) [grants HA 1672/17-1 and GRK 1384] for funding.

## REFERENCES

- Brännvall M, Kirsebom LA. 2005. Complexity in orchestration of chemical groups near different cleavage sites in RNase P RNA mediated cleavage. *J Mol Biol* **351**: 251-257.
- Brännvall M, Mattsson JG, Svärd SG, Kirsebom LA. 1998. RNase P RNA structure and cleavage reflect the primary structure of tRNA genes. *J Mol Biol* **283**: 771-783.
- Brown JW, Nolan JM, Haas ES, Rubio MA, Major F, Pace NR. 1996. Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural microbial populations reveals tertiary structural elements. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 3001–3006.
- Buck AH, Kazantsev AV, Dalby AB, Pace NR. 2005. Structural perspective on the activation of RNase P RNA by protein. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 958-964.
- Busch S, Kirsebom LA, Notbohm H, Hartmann RK. 2000. Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA. *J Mol Biol.* **299**: 941-951.
- Childs JL, Poole AW, Turner DH. 2003. Inhibition of *Escherichia coli* RNase P by oligonucleotide directed misfolding of RNA. *RNA* **9**: 1437–1445.
- Ellis JC, Brown JW. 2010. The evolution of RNase P and its RNA. In: Liu F, Altman S, editors. Ribonuclease P. New York: Springer. p. 17–40.
- Eubank TD, Biswas R, Jovanovic M, Litovchick A, Lapidot A, Gopalan V. 2002. Inhibition of bacterial RNase P by aminoglycoside-arginine conjugates. *FEBS Lett* **511**: 107-112.
- Dong H, Kirsebom LA, Nilsson L. 1996. Growth rate regulation of 4.5 S RNA and M1 RNA the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNase P. *J Mol Biol* **261**: 303–308.
- Frank DN, Pace NR. 1998. Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu Rev Biochem* **67**: 153–180.
- Gimple O, Schön A (2014) Direct determination of RNA sequence and modification by radiolabeling methods. In: Handbook of RNA Biochemistry, 2nd ed. (Hartmann, R. K., Bindereif, A., Schön, A. and Westhof, E. (eds.) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 175-204.

- Gössringer M, Hartmann RK. 2007. Function of heterologous and truncated RNase P proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **66**: 801-813.
- Gößringer M, Kretschmer-Kazemi Far R, Hartmann RK. 2006. Analysis of RNase P protein (*mpA*) expression in *Bacillus subtilis* utilizing strains with suppressable *mpA* expression. *J Bacteriol* **188**: 6816-6823.
- Gruegelsiepe H, Brandt O, Hartmann RK. 2006. Antisense inhibition of RNase P: mechanistic aspects and application to live bacteria. *J Biol Chem* **281**: 30613-30620.
- Gruegelsiepe H, Schön A, Kirsebom LA, Hartmann RK (2005) Enzymatic RNA synthesis using bacteriophage T7 RNA polymerase. in: Handbook of RNA Biochemistry (Hartmann, R. K., Bindereif, A., Schön, A. and Westhof, E. (eds.) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 3-21.
- Gruegelsiepe H, Willkomm DK, Goudinakis O, Hartmann RK. 2003. Antisense inhibition of *Escherichia coli* RNase P RNA: mechanistic aspects. *Chembiochem* **4**: 1049-1056.
- Haas ES, Banta AB, Harris JK, Pace NR, Brown JW. 1996. Structure and evolution of ribonuclease P RNA in Gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res* **24**: 4775-4782.
- Haas ES, Brown JW, Pitulle C, Pace NR. 1994. Further perspectives on the catalytic core and secondary structure of ribonuclease P RNA. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 2527–2531.
- Hartmann RK, Gößringer M, Späth B, Fischer S, Marchfelder A. 2009. The making of tRNAs and more—RNase P and tRNase Z. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**: 319–368.
- Heide C, Feltens R, Hartmann RK. 2001. Purine N7 groups that are crucial to the interaction of *Escherichia coli* RNase P RNA with tRNA. *RNA* **7**: 958-968.
- Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmanith W. 2008. RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* **135**: 462–474.
- Hori Y, Rogert MC, Tanaka T, Kikuchi Y, Bichenkova EV, Wilton AN, Gbaj A, Douglas KT. 2005. Porphyrins and porphines bind strongly and specifically to tRNA, precursor tRNA and to M1 RNA and inhibit the ribonuclease P ribozyme reaction. *Biochim Biophys Acta* **1730**: 47-55.

- Jarrous N, Gopalan V. 2010. Archaeal/Eukaryal RNase P: subunits, functions and RNA diversification. *Nucleic Acids Res* **38**: 7885-7894.
- Kawamoto SA, Sudhakar CG, Hatfield CL, Sun J, Berham EJ, Gopalan V. 2008. Studies on the mechanism of inhibition of bacterial ribonuclease P by aminoglycoside derivatives. *Nucleic Acids Res* **36**: 697-704.
- Kazantsev AV, Krivenko AA, Harrington DJ, Holbrook SR, Adams PD, Pace NR. 2005. Crystal structure of a bacterial ribonuclease P RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13392-13397.
- Kazantsev AV, Pace NR. 2006. Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol* **4**: 729-740.
- Kazantsev AV, Rambo RP, Karimpour S, Santalucia J Jr, Tainer JA, Pace NR. 2011. Solution structure of RNase P RNA. *RNA* **17**: 1159-1171.
- Kikovska E, Svärd SG, Kirsebom LA. 2007. Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2062-2067.
- Kirsebom LA, Baer MF, Altman S. 1988. Differential effects of mutations in the protein and RNA moieties of RNase P on the efficiency of suppression by various tRNA suppressors. *J Mol Biol* **204**: 879-888.
- Krasilnikov AS, Xiao Y, Pan T, Mondragón A. 2004. Basis for structural diversity in homologous RNAs. *Science* **306**: 104-107.
- Krasilnikov AS, Yang X, Pan T, Mondragón A. 2003. Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature* **421**: 760-4.
- Lai LB, Vioque A, Kirsebom LA, Gopalan V. 2010. Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects. *FEBS Lett* **584**: 287-296.
- Lechner M, Rossmannith W, Hartmann RK, Thölken C, Gutmann B, Giegé P, Gobert A. 2015. Distribution of Ribonucleoprotein and Protein-Only RNase P in Eukarya. *Mol Biol Evol* **32**: 3186-3193.

- Li D, Gössringer M, Hartmann RK. 2011. Archaeal-bacterial chimeric RNase P RNAs: towards understanding RNA's architecture, function and evolution. *ChemBiochem* **12**: 1536-1543.
- Li D, Willkomm DK, Hartmann RK. 2009. Minor changes largely restore catalytic activity of archaeal RNase P RNA from *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Nucleic Acids Res* **37**: 231-242.
- Liu X, Chen Y, Fierke CA. 2014. A real-time fluorescence polarization activity assay to screen for inhibitors of bacterial ribonuclease P. *Nucleic Acids Res* **42**:e159.
- Loria A, Pan T. 1996. Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P. *RNA* **2**: 551-63.
- Massire C, Jaeger L, Westhof E. 1997. Phylogenetic evidence for a new tertiary interaction in bacterial RNase P RNAs. *RNA* **3**: 553–556.
- Massire C, Jaeger L, Westhof E. 1998. Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis. *J Mol Biol* **279**: 773–793.
- Marszalkowski M, Teune JH, Steger G, Hartmann RK, Willkomm DK. 2006. Thermostable RNase P RNAs lacking P18 identified in the *Aquificales*. *RNA* **12**: 1915-1921.
- Marszalkowski M, Willkomm DK, Hartmann RK. 2008. Structural basis of a ribozyme's thermostability: P1-L9 interdomain interaction in RNase P RNA. *RNA* **14**: 127-133.
- Mikkelsen NE, Brannvall M, Virtanen A, Kirsebom LA. 1999. Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6155-6160.
- Niranjanakumari S, Kurz JC, Fierke CA. 1998. Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **26**: 3090-3096.
- Pannucci JA, Haas ES, Hall TA, Harris JK, Brown JW. 1999. RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7803-7808.
- Reiter NJ, Osterman A, Torres-Larios A, Swinger KK, Pan T, Mondragón A. 2010. Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature* **468**: 784-789.

- Schedl P, Primakoff P, Roberts J. 1974. Processing of *E. coli* tRNA precursors. *Brookhaven Symp Biol* **26**: 53-76.
- Svård SG, Kagardt U, Kirsebom LA. 1996. Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate. *RNA* **2**: 463-472.
- Svård SG, Mattsson JG, Johansson KE, Kirsebom LA. 1994. Cloning and characterization of the RNase P RNA genes from two porcine mycoplasmas. *Mol Microbiol* **11**: 849-859.
- Torres-Larios A, Swinger KK, Krasilnikov AS, Pan T, Mondragón A. 2005. Crystal structure of the RNA component of bacterial ribonuclease P. *Nature* **437**: 584-587.
- Toumpeki C, Vourekas A, Kalavrizioti D, Stamatopoulou V, Drainas D. 2008. Activation of bacterial ribonuclease P by macrolides. *Biochemistry* **47**: 4112-4118.
- Vioque A. 1989. Protein synthesis inhibitors and catalytic RNA. Effect of puromycin on tRNA precursor processing by the RNA component of *Escherichia coli* RNase P. *FEBS Lett* **246**: 137-139.
- Walker SC, Marvin MC, Engelke DR. 2010. Eukaryote RNase P and RNase MRP. In: Liu F, Altman S, editors. Ribonuclease P, protein reviews. Vol. 10. New York: Springer. pp. 173–202.
- Warnecke JM, Held R, Busch S, Hartmann RK. 1999. Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **290**: 433-445.
- Wegscheid B, Hartmann RK. 2006. The precursor tRNA 3'-CCA interaction with *Escherichia coli* RNase P RNA is essential for catalysis by RNase P *in vivo*. *RNA* **12**: 2135-2148.
- Wegscheid B, Hartmann RK. 2007. *In vivo* and *in vitro* investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA. *Nucleic Acids Res* **35**: 2060-2073.
- Willkomm DK, Gruegelsiepe H, Goudinakis O, Kretschmer-Kazemi Far R, Bald R, Erdmann VA, Hartmann RK. 2003. Evaluation of bacterial RNase P RNA as a drug target. *Chembiochem* **4**: 1041-1048.
- Willkomm D, Pfeffer P, Reuter K, Klebe G, Hartmann R. 2010. RNase P as a drug target. In: Liu, F and Altman, S (eds). Ribonuclease P. Springer, New York, 10, pp. 235–256.

## Figure Legends and Tables

**Fig. 1: (A)** Secondary structure of *B. subtilis* RNase P RNA according to Massire et al. (1998). The S-domain is shown above the gray background, the remainder of the molecule belongs to the C-domain. The complementarity to RNA oligonucleotides targeting the P5.1 region is indicated by the red and green lines along the sequence. Dotted lines indicate long-range tertiary interactions. A possible P1-L9 contact, although unlikely to form based on this study and the lack of phylogenetic evidence (Massire et al. 1997), is marked with a question mark. **(B)** RNA-alone activity assays for determining the inhibitory effect of antisense RNAs, performed under multiple turnover conditions with 10 nM P RNA and 100 nM ptRNA<sup>Gly</sup> substrate at 37°C (for details, see Material and Methods). AS1-long and AS2-long are 66-nt long RNA oligonucleotides with 20 or 21 central nucleotides complementary to *B. subtilis* P RNA as indicated by the colored lines in panel A (for details, see the Supplementary Material). AS1 lacks the extra 18 5'-terminal and 28 3'-terminal nucleotides flanking the 20 P RNA-complementary nucleotides in AS1-long. Values are the mean of five independent experiments each, error bars are standard deviations.

**Fig. 2: (A)** Top and middle: structural environment of P5.1 and P15.1 in *B. subtilis* wt P RNA and its deletion variant  $\Delta$ 15.1. The sequence complementary to RNA oligonucleotide AS1 is indicated by the red line adjacent to the wt sequence. Invasion of AS1 disrupts the tertiary contact to L15.1, as indicated by the red double slash. G70, G72, G258, G259, G262-265 and G305 are highlighted, as their susceptibility to RNase T1 cleavage under native conditions (based on the data shown in panels C and D) was changed upon AS1 hybridization and/or introduction of the  $\Delta$ 15.1 mutation (indicated by orange lettering) which abrogates the L5.1-L15.1 contact (orange double slash). Filled blue arrows: increased susceptibility to RNase T1 cleavage in the presence of oligonucleotide or in the  $\Delta$ 15.1 mutant; open blue arrows: reduced susceptibility to RNase T1 cleavage; arrow size illustrates the relative strength of the effect. G258/259 (highlighted in purple) form Watson-Crick base



pairs with pre-tRNA 3'-CCA ends (Wegscheid and Hartmann, 2007). Bottom: summary of changes in RNase T1 susceptibility in regions P8/P9/P10.1 upon AS1 annealing. **(B)** Native PAGE analysis of *B. subtilis* wt P RNA and the  $\Delta 15.1$  mutant with and without preannealed oligonucleotide AS1. For details, see Materials and Methods. **(C, D)** Structural probing of *B. subtilis* wt P RNA with or without preannealed RNA oligonucleotide AS1, and of the  $\Delta 15.1$  mutant P RNA, either using **(C)** 5'-<sup>32</sup>P-labeled or **(D)** 3'-<sup>32</sup>P-labeled RNase P RNA; Ctr: same conditions as for native RNase T1 cleavage, but omission of RNase T1; A, U, iodine cleavage of P RNAs transcribed with trace amounts of  $\alpha$ S-ATP and  $\alpha$ S-UTP, respectively; T1, limited digestion of P RNA by RNase T1 under native conditions either alone or in the presence of oligonucleotide AS1 or a control RNA 23-mer (5'- CAA GCA GCC UAC CAG CUA CCU UG-3'; Willkomm et al., 2003) of unrelated sequence (Ctr.oligo); G, cleavage by RNase T1 3' of G residues under denaturing conditions. G residues assigned at the gel margin according to the numbering system of *B. subtilis* wt P RNA (see Fig. 1) are further marked by a dot next to the corresponding RNase T1 cleavage band. Positions with a marked difference in band intensities between wt P RNA and the mutant and/or in the presence of the RNA oligonucleotide AS1 are highlighted by lettering in bold italics. The red dashed vertical line between lines 7 and 8 (panel C) denotes cleavage protection due to oligonucleotide annealing, the orange dashed lines (panel D) indicate regions of band compression/decompression of the wt versus the mutant P RNA. The orange " $\Delta$ " next to lane 19 indicates the deletion in RNA  $\Delta 15.1$ . For blue arrows, see legend to panel A. The gel images shown in panels C and D are each representative of three independent experiments. Signals at positions 262-265 in lane 15 of panel D were somewhat enhanced in other gels. Comment to lanes 12 and 14 vs. 15 in panel D: the signals corresponding to G258/259 comigrate as a single band in lanes 12 and 14, but migrate as a doublet in lane 15; phosphorimager quantification of this single band in lanes 12 and 14 gave reproducibly higher signal intensities relative to the doublet signal in lane 15 (normalized to overall radioactivity in each lane).

**Fig. 3:** RNA-alone single turnover kinetics of *B. subtilis* wt P RNA and mutant RNAs  $\Delta 15.1$ , mL9 and P9Mf. **(A)** Structural alterations in RNase P RNA variants mL9 and P9Mf relative to the wt RNA (marked by red lettering). In variant mL9, the *B. subtilis* GNRA P9 tetraloop 5'-UUAG was changed into 5'-GUUU to change the base identity of all four nucleotides. In P9Mf, *B. subtilis* P9 was truncated to the shortened P9 version naturally occurring in P RNAs of *Mycoplasma fermentans* and *M. flocculare*, expected to be unable to form any P9-P1 interaction because of being too short. **(B)** Curve fits of single turnover kinetic experiments (RNA-alone reaction) to determine the kinetic parameters  $k_{\text{react}}$  and  $K_{\text{m(sto)}}$  of *B. subtilis* wt P RNA and variants  $\Delta 15.1$ , mL9 and P9Mf (see Table 1). The data are based on at least three independent experiments; error bars are standard deviations of the mean (SEM).

**Fig. 4:** LB agar plates with *E. coli* BW cells transformed with the empty expression vector pACYC or the same plasmid harboring either the native *E. coli rnpB* gene, the *B. subtilis* wt or  $\Delta 15.1$  P RNA structural gene each fused to the *E. coli rnpB* promoter. Cells were grown for 2 days under permissive (arabinose) or non-permissive (glucose) conditions at 37°C. The more cauliflower-like colony appearance of BW cells expressing *B. subtilis rnpB* under glucose conditions can be attributed to slower colony growth (less efficient complementation). For further details, see Materials and Methods.

**Fig. 5:** Oligonucleotide inhibition of preformed *B. subtilis* RNase P holoenzymes (holoenzyme assay II, see Materials and Methods) acting on pre-tRNA<sup>Gly</sup> as substrate. **(A)** Target regions of the RNA oligonucleotides in *B. subtilis* P RNA (for details on oligonucleotide sequence and modification, see Materials and Methods). G258/259 (highlighted in purple) form Watson-Crick base pairs with pre-tRNA 3'-CCA ends (Wegscheid and Hartmann, 2007). **(B, C)** Processing activity ( $k_{\text{obs}}$ ) after preincubation of holoenzyme and oligonucleotide at 37°C **(B)** or 50°C **(C)** for either 5, 10, 15, 20 or 30 min. The data are based on three independent experiments; error bars are standard deviations of the mean (SEM).

**Fig. 6:** Normalized rate ( $k_{\text{rel}}$  = ratio of rate for the inhibited reaction divided by that for the uninhibited reaction) of ptRNA<sup>Gly</sup> cleavage by the preassembled *B. subtilis* RNase P holoenzyme as a function of the concentration of the LNA/DNA mixmer AS4-LNA. Holoenzyme and inhibitor were preincubated for 15 min at 37°C before substrate addition. IC<sub>50</sub> ( $\pm$  standard error of the fit) indicates the oligonucleotide concentration at which the cleavage rate reached 50% of rate for the uninhibited reaction. The data are based on at least three independent experiments; error bars are SEMs. For data fitting to obtain  $k_{\text{rel}}$ , see legend to Fig. S3.

**Fig. 7:** Tertiary structure model of *G. stearothermophilus* type B RNase P RNA (Kazantsev et al. 2005) in complex with tRNA<sup>Phe</sup> (Buck et al. 2005) to illustrate the architectural role of the L5.1-L15.1 contact and its vicinity to the L15 loop interacting with C74 and C75 of tRNA 3'-ends (highlighted as pink spheres). The green sphere marks the 5'-terminal nucleotide of mature tRNA.

**Table 1: Single turnover kinetic parameters of *B. subtilis* P RNA variants (RNA-alone reaction)**

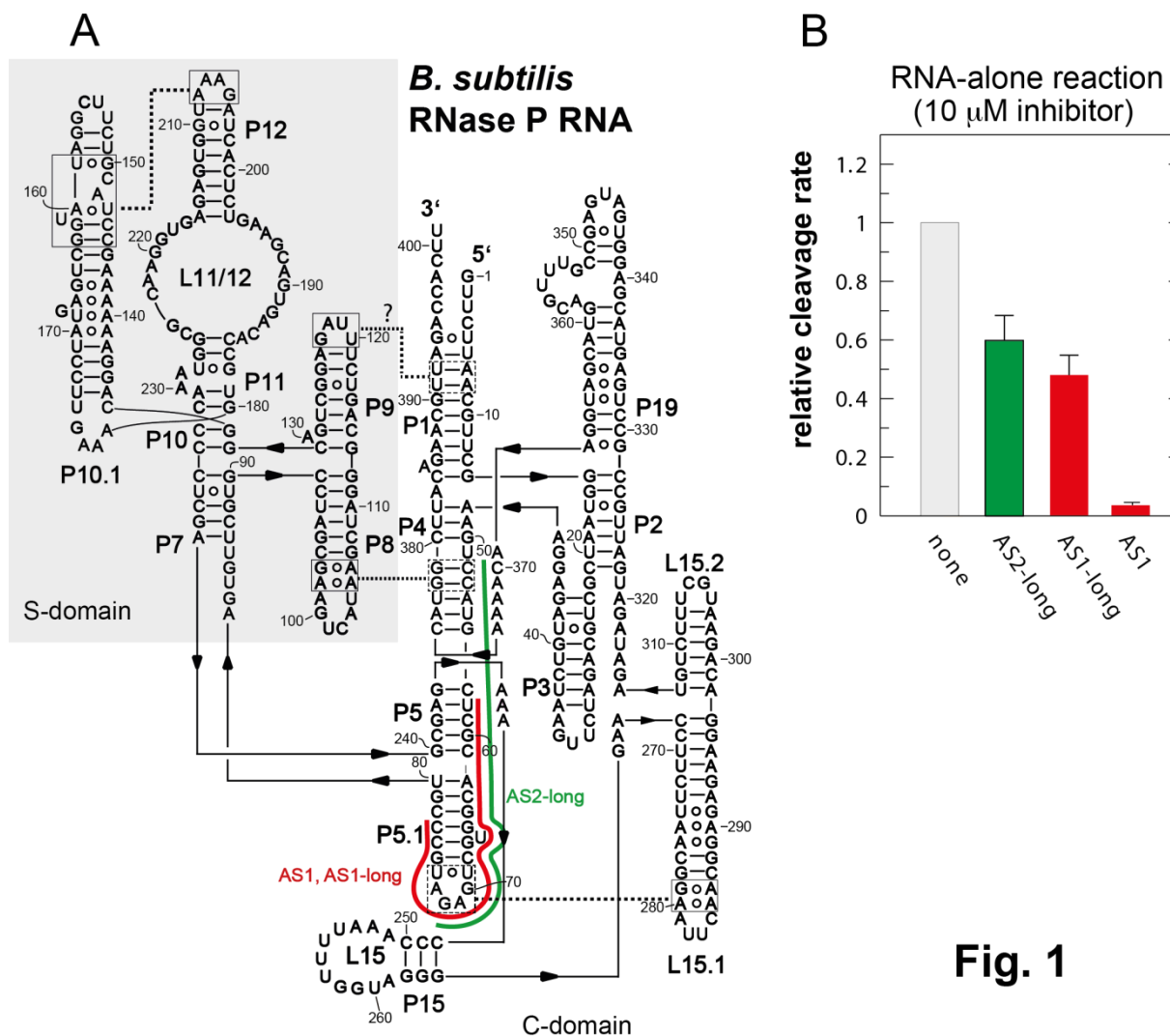
P RNA	$k_{\text{react}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_{\text{m(sto)}}$ [μM]	$K_{\text{react}} / K_{\text{m(sto)}}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
wt	5.7 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.004	0.47 x 10 <sup>6</sup>
mL9	5.4 $\pm$ 0.13	0.16 $\pm$ 0.02	0.56 x 10 <sup>6</sup>
P9Mf	5.1 $\pm$ 0.11	0.28 $\pm$ 0.02	0.30 x 10 <sup>6</sup>
Δ15.1	0.43 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.05	0.75 x 10 <sup>4</sup>

For details, see Materials and Methods;  $k_{\text{react}}$  and  $K_{\text{m(sto)}}$  values are mean values from at least three independent experiments; errors are standard errors of the curve fit.

**Table 2: Holoenzyme reactions for wt *B. subtilis* P RNA and mutants thereof**

RNA	$k_{\text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]	
	P protein	without protein
wt	25 ± 9	0.005 ± 0.001
mL9	29 ± 14	0.005 ± 0.001
P9Mf	28 ± 13	0.004 ± 0.001
Δ15.1	2.1 ± 0.3	0.001 ± 0.000
no RNA	--	--

Reactions were performed as described in Materials and Methods. Preincubations and holoenzyme assembly were performed according to holoenzyme assay I conditions;  $k_{\text{obs}}$  values are mean from at least three independent experiments (± SD).



**Fig. 1**

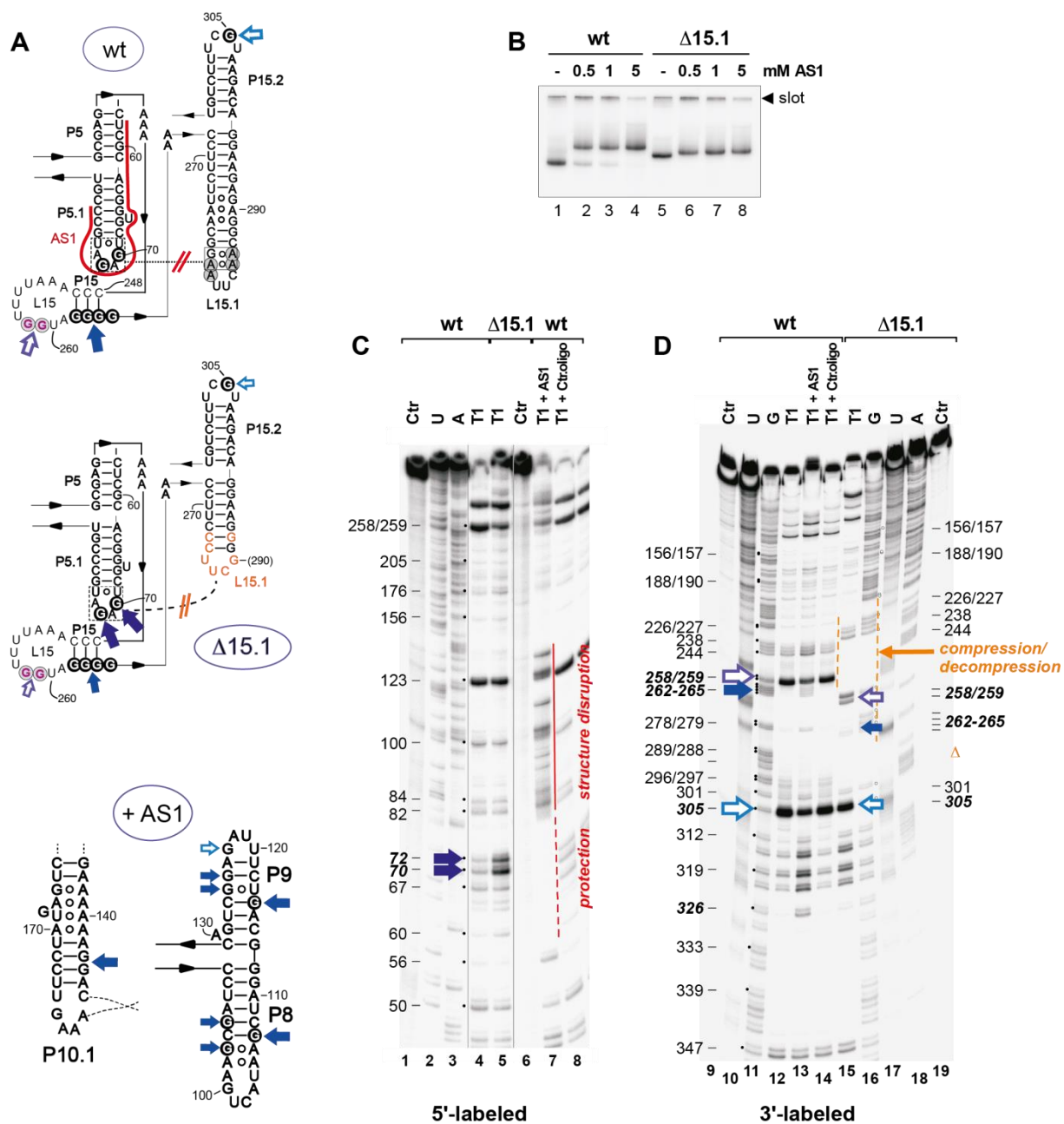
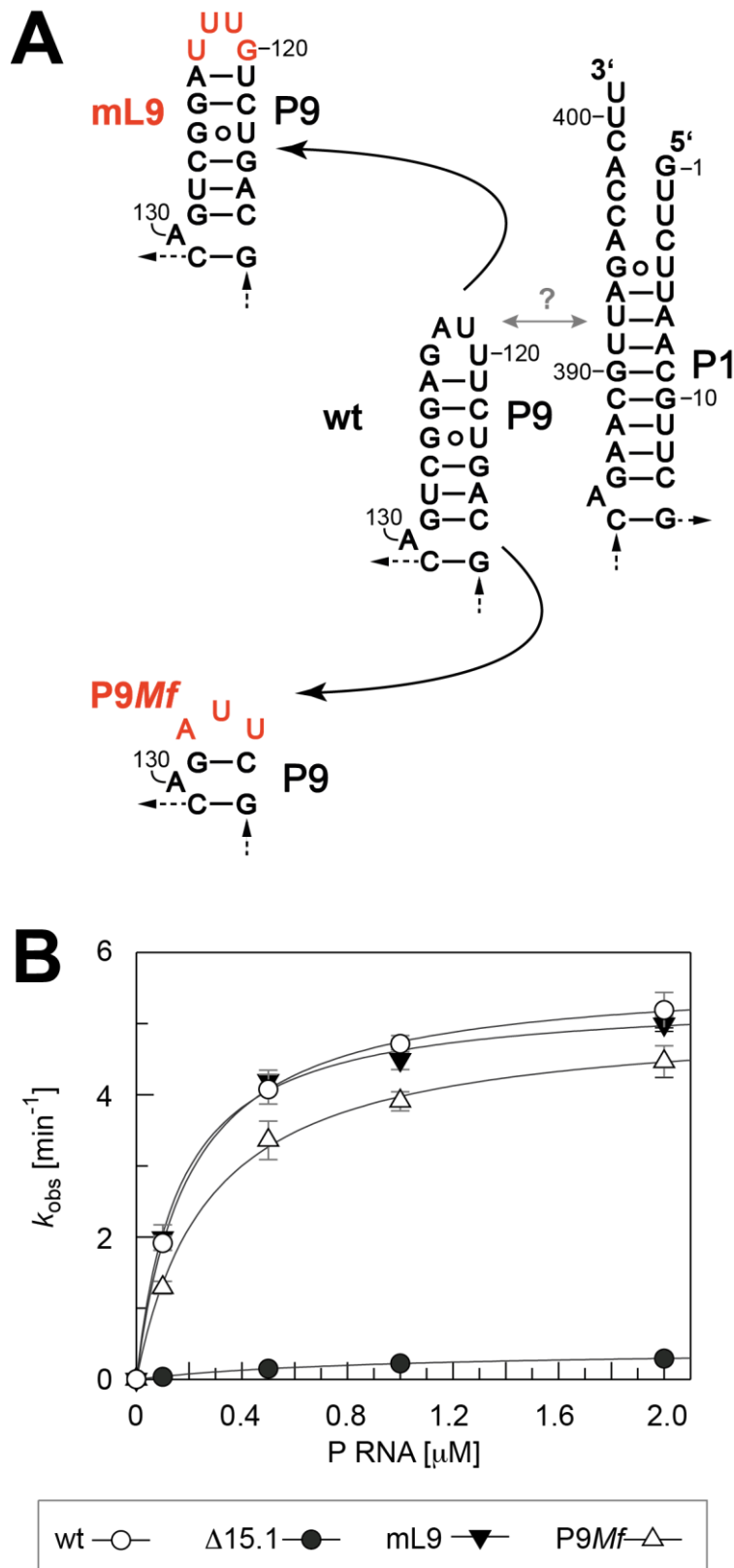
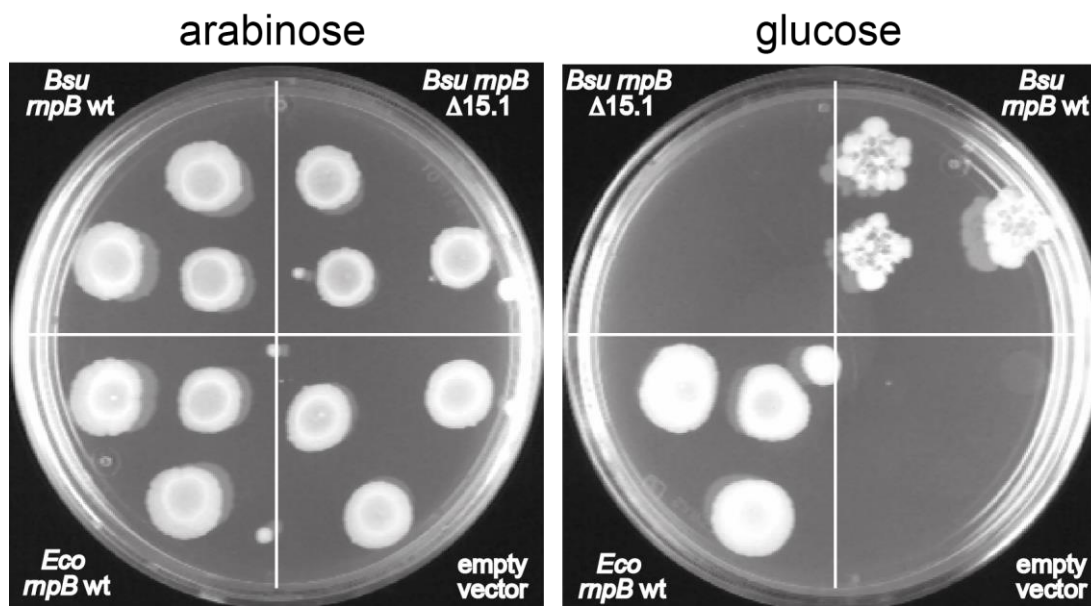


Fig. 2



**Fig. 3**

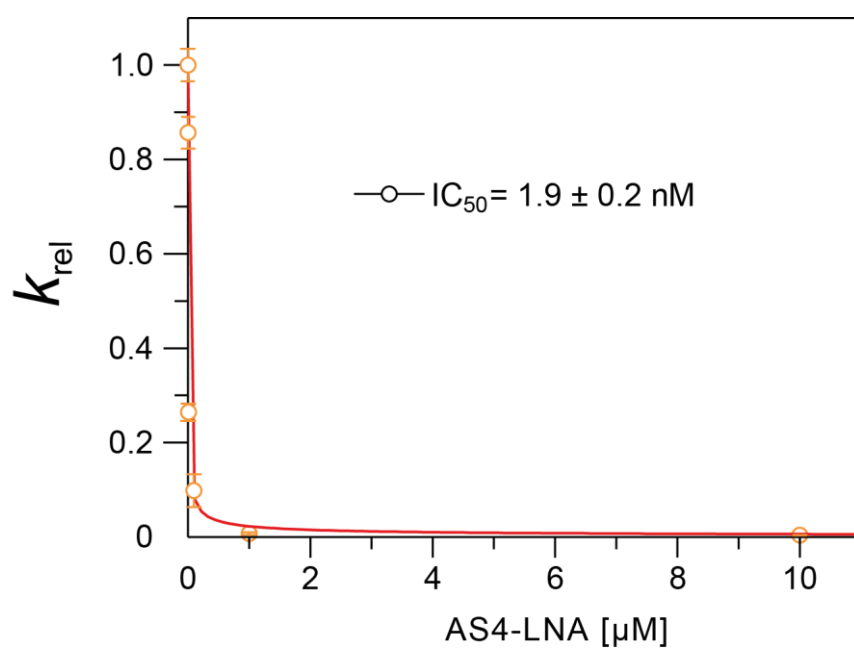
*E. coli* BW

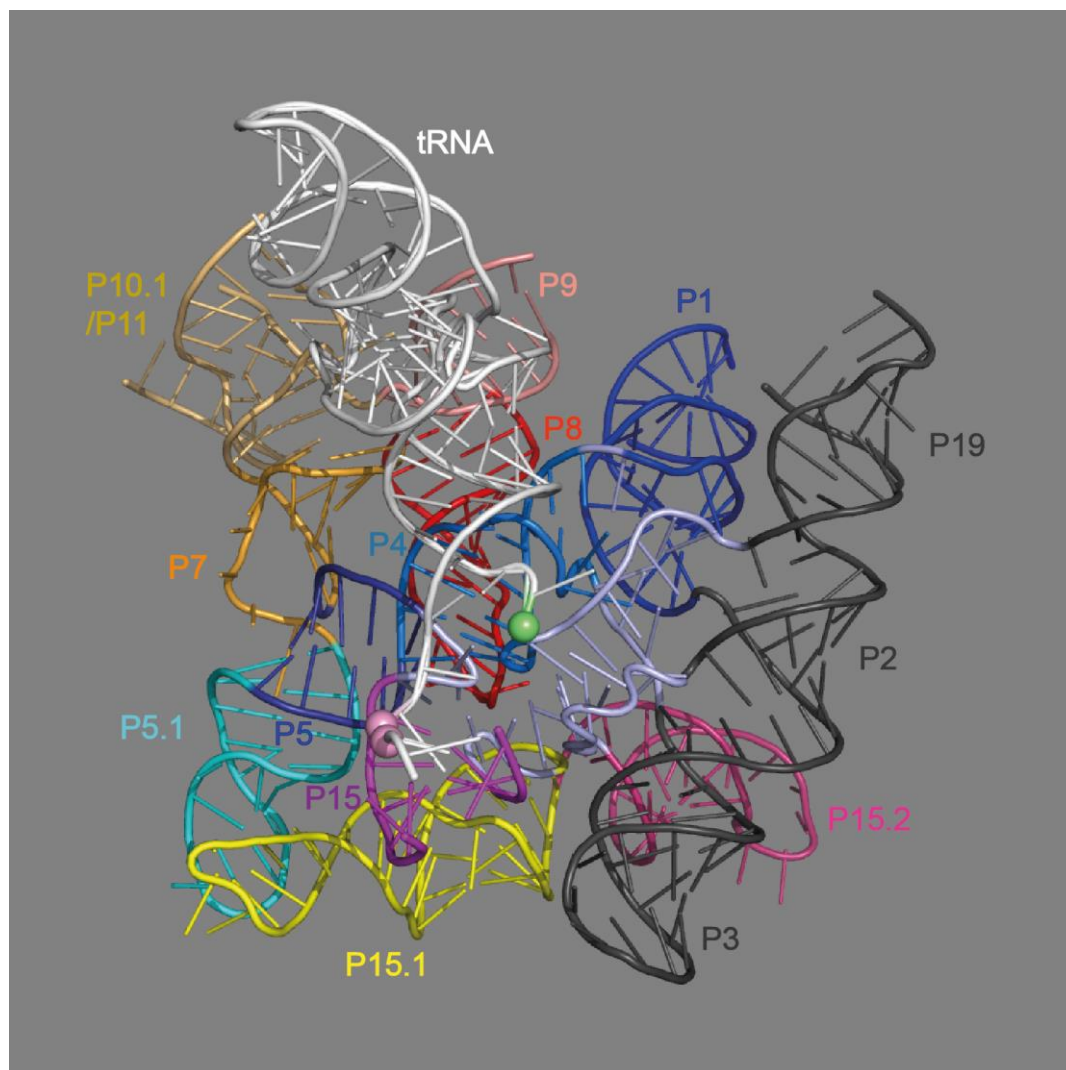


**Fig. 4**





**Fig. 6**



**Fig. 7**

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **Bacterial type B RNase P - functional characterization of the L5.1-L15.1 tertiary contact and antisense inhibition**

Dennis Walczyk<sup>1</sup>, Dagmar K. Willkomm<sup>2</sup>, Roland K. Hartmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg,  
Marbacher Weg 6, D-35037 Marburg, Germany, e-mail: roland.hartmann@staff.uni-marburg.de

<sup>2</sup> Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

### Generation of the RNA starting library for SELEX experiments

Our SELEX strategy followed the approach published by Kjems and coworkers (illustrated in Fig. S1; Lützelberger et al. 2005). To generate an antisense RNA oligonucleotide library specific to *B. subtilis* RNase P RNA, 200 µg of plasmid pSP64 encoding *B. subtilis* *mnpB* (Wegscheid et al. 2006) were sonicated to yield fragment sizes of ~600 bp. The fragment ends were polished with the Klenow fragment of DNA polymerase I and the 5'-ends were subsequently phosphorylated by T4 polynucleotide kinase. The fragments were then ligated to a T7 linker made from annealed oligonucleotides 5'-adapter # 595 (5'-AGC CTG CAG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TCG CTT AGT CCG AC, T7 promoter in italics, *Pst*I and *Mme*I recognition sites underlined) and 5'-phosphorylated 5'-adapter # 596 (5'-GTC GGA CTA AGC GAT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC TGC AGG CTG-3'). The ligation products were digested with *Mme*I, cleaving within the plasmid fragments 20/18 nt downstream of the recognition site contained in the T7 linker. The resulting 62-bp cleavage products were eluted from a 6% native polyacrylamide gel and ligated to an SP6 linker, generated from annealed DNA oligonucleotides SP6-1 (5'-CTT CTA TAG TGT CAC CTA AAT GAA TTC G-3') and SP6-2 (5'-GAA TTC ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG NN-3') and containing an SP6 promoter sequence and an *Eco*RI site. This second 91-bp ligation product was again gel-purified and amplified by PCR with primers 5' adapter # 595 and SP6-PCR (5'-CGA ATT CAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'). An aliquot of PCR products was immediately cloned, using the TOPO 2.1 PCR cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, to assess the quality of the DNA library by sequencing of plasmid DNA from single clones.

For preparation of the RNA oligonucleotide library, the final PCR product served as template for T7 transcription using the MEGAshortscript™ High Yield Transcription Kit (Ambion) following the manufacturer's protocol. The 66-nt long transcripts were digested with DNase I, extracted with phenol/chloroform (1:1), precipitated with ethanol and dissolved in water.

### Mobility shift assays

<sup>32</sup>P-labeled RNase P RNA for gel mobility shift assays was generated by T7 transcription in the presence of α-<sup>32</sup>P-UTP using the same kit (Ambion) as above and plasmid pDW66 linearized with *Dra*I encoding *B. subtilis* RNase P RNA (Warnecke et al. 1999). Transcription products were purified by 4% denaturing PAGE. For the gel mobility shift assay, labeled RNase P RNA was preincubated in 1 x inhibition buffer (100 mM NH<sub>4</sub>OAc, 50 mM HEPES pH 7 and 2.5 mM or 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>) for 40 min at 37°C, and the RNA oligonucleotide

library was denatured for 2 min at 95°C followed by immediate chilling on ice. RNA oligonucleotide library and labeled RNase P RNA solutions were then mixed to final amounts of 0.3 pmol RNase P RNA and ~ 5 pmol library (final volume: ~ 12 µL), followed by incubation for 30 min at 37°C. After addition of an equal volume of native loading buffer (10% glycerol, 0.025% each xylene cyanol and bromophenol blue, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) samples were loaded onto a 5 to 5.5% native polyacrylamide gel (see example in Fig. S2) prepared and run with buffer THEAM (66 mM HEPES, 33 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NH<sub>4</sub>OAc and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). A sample without RNA oligonucleotide library served as a negative control. Areas of increased radioactive smear immediately above the main RNase P RNA band in lanes representing RNase P RNA/library mixtures were excised from the gel, eluted in 1 M NaOAc pH 4.9 at 10°C or room temperature overnight; after ethanol precipitation, the RNA was redissolved in ddH<sub>2</sub>O. A total of three selection rounds was performed, each round in parallel at 2.5 and 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>. After RT-PCR amplification (see below) of RNA oligonucleotides associated with the excised gel material, a new selection cycle was initiated by T7 transcription of the RNA library enriched in binders.

#### *RT-PCR*

Reverse transcription was performed exactly as in (Lützelberger et al. 2005). Briefly, half of the gel-eluted RNA (see above) was heated with 2 pmol of primer SP6-PCR for 5 min at 70°C and chilled on ice for 5 min. Reverse transcription was performed with AMV reverse transcriptase (Promega) for 1 h at 42°C. cDNAs were amplified in 40-45 PCR cycles using Taq DNA polymerase and primers #595 and SP6-PCR (see above). PCR products were either cloned (for sequencing) and/or used as transcription templates to generate an RNA pool for the next round of selection.

#### *Transcription of individual library clones for inhibition assays*

Transcription templates were produced by PCR with primers SP6-PCR and 595 on the respective PCR 2.1 TOPO plasmid as template; PCR products were purified with the Qiagen Gel Extraction Kit. After transcription with T7 RNA polymerase according to standard procedures (Gruegelsiepe et al. 2005), transcription products were separated by 10% denaturing PAGE, and the major product bands were excised, eluted overnight under shaking at 4°C in 1 M NaOAc pH 4.9, precipitated with ethanol and redissolved in ddH<sub>2</sub>O.

**Fig. S1:** (A) Diagram of RNA library construction. The plasmid encoding *B. subtilis rnpB* was sonicated to yield fragment sizes of ~600 bp. After repairing the frayed ends to blunt ends by Klenow polymerase and 5'-end phosphorylation, fragments were ligated to the T7 linker. After digestion of ligation products with *MmeI*, which cuts 20/18 nt downstream of its recognition site, fragments were additionally ligated to the SP6 promoter linker. The library was amplified by PCR and used for T7 transcription, generating 66-nt long transcripts (adapted from Lützelberger et al. 2005). (B) Sequence of the PCR products used for T7 transcription of the RNA library (restriction sites in red lettering, T7 core promoter sequence in italics, *rnpB* plasmid-derived sequences indicated by letter N).

**Fig. S2:** 5% native PAGE of *B. subtilis* P RNA after preincubation with a library of RNA oligonucleotides complementary to *B. subtilis* P RNA. The indicated area of retarded mobility (shifted material) was excised, eluted and used to generate the library for the next selection cycle (see above experimental for details).

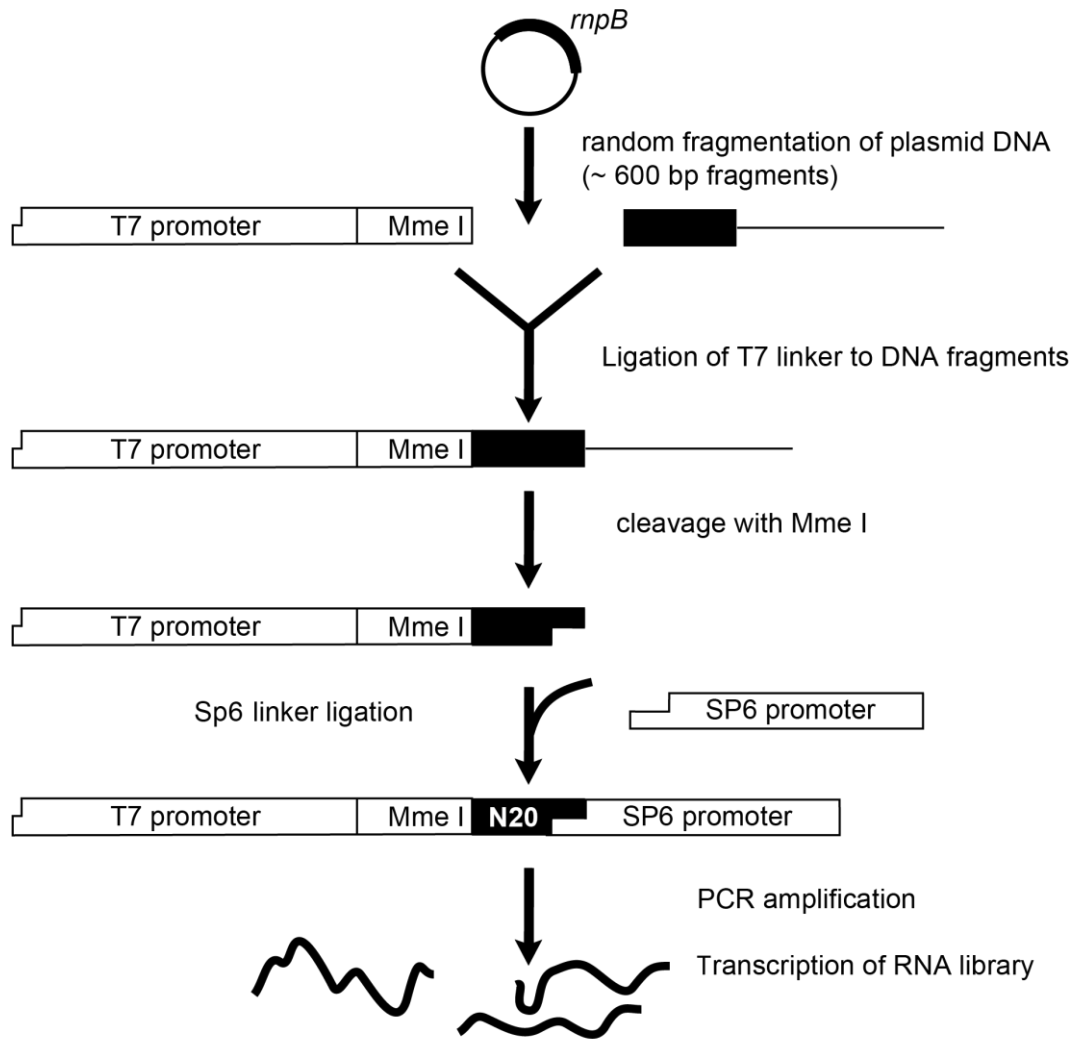
**Fig. S3:** Normalized rates ( $k_{\text{rel}} = k_{\text{obs}}$  for the inhibited reaction divided by  $k_{\text{obs}}$  for the uninhibited reaction) for cleavage of ptRNA<sup>Gly</sup> by (A) *B. subtilis* P RNA alone or (B) the *B. subtilis* RNase P holoenzyme as a function of the concentration of RNA oligonucleotide AS1. In P RNA-alone reactions (B), P RNAs and AS1 were preincubated for 40 min at 37°C in reaction buffer (100 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 100 mM NH<sub>4</sub>OAc and 50 mM HEPES, pH 7.0) before addition of substrate. In the applied holoenzyme assay I setup, P RNA and inhibitor were preincubated for 5 min at 55°C followed by 50 min at 37°C. Then RNase P protein was added, followed by another 5 min at 37°C. Finally, pre-tRNA (preincubated for 5 min at 55°C and for 25 min at 37°C) was added to start the reaction. Aliquots were withdrawn at several timepoints to determine  $k_{\text{obs}}$  values as described (Busch et al. 2000). Data points are based on at least three independent experiments. Calculation of  $k_{\text{rel}}$  and determination of IC<sub>50</sub>: for all reactions without inhibitor, a mean value was calculated; then all individual  $k_{\text{obs}}$  values (including those for the uninhibited reaction) were divided by this mean value for the uninhibited reaction, yielding the  $k_{\text{rel}}$  values; then the mean values and standard errors of the mean (SEM; shown in red colouring in panels A and B) were calculated from  $k_{\text{rel}}$  values at the same inhibitor concentration; the data were fit with Grafit 5.0.13 (Erithacus Software Ltd., UK) to the equation  $y = \text{Range}/[1 + (x/\text{IC}_{50})^s]$ , with *Range* indicating the fitted uninhibited value, *s* the slope factor,  $y = k_{\text{rel}}$  and  $x$  = inhibitor concentration. IC<sub>50</sub> values are given with the standard error of the curve fit.

## References

- Busch S, Kirsebom LA, Notbohm H, Hartmann RK. 2000. Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA. *J Mol Biol* **299**: 941-951.
- Gruegelsiepe H, Schön A, Kirsebom LA, Hartmann RK. 2005. Enzymatic RNA synthesis using bacteriophage T7 RNA polymerase. in: Handbook of RNA Biochemistry (Hartmann, R. K., Bindereif, A., Schön, A. and Westhof, E. (eds.) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 3-21.
- Lützelberger M, Jakobsen MR, Kjems J. 2005. SELEX strategies to identify antisense and protein target sites in RNA of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes. in: Handbook of RNA Biochemistry (Hartmann, R. K., Bindereif, A., Schön, A. and Westhof, E. (eds.) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 878-894.
- Warnecke JM, Held R, Busch S, Hartmann RK. 1999. Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **290**: 433-445.
- Wegscheid B, Condon C, Hartmann RK. 2006. Type A and B RNase P RNAs are interchangeable *in vivo* despite substantial biophysical differences. *EMBO Rep* **7**:411–417.



A



B

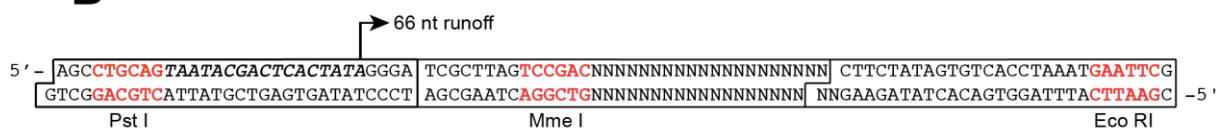


Fig. S1

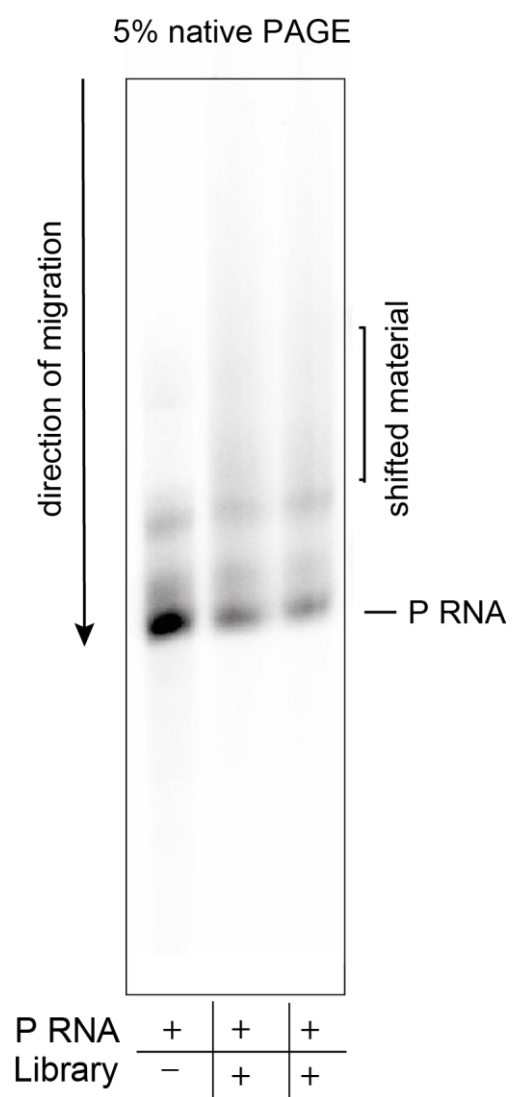


Fig. S2

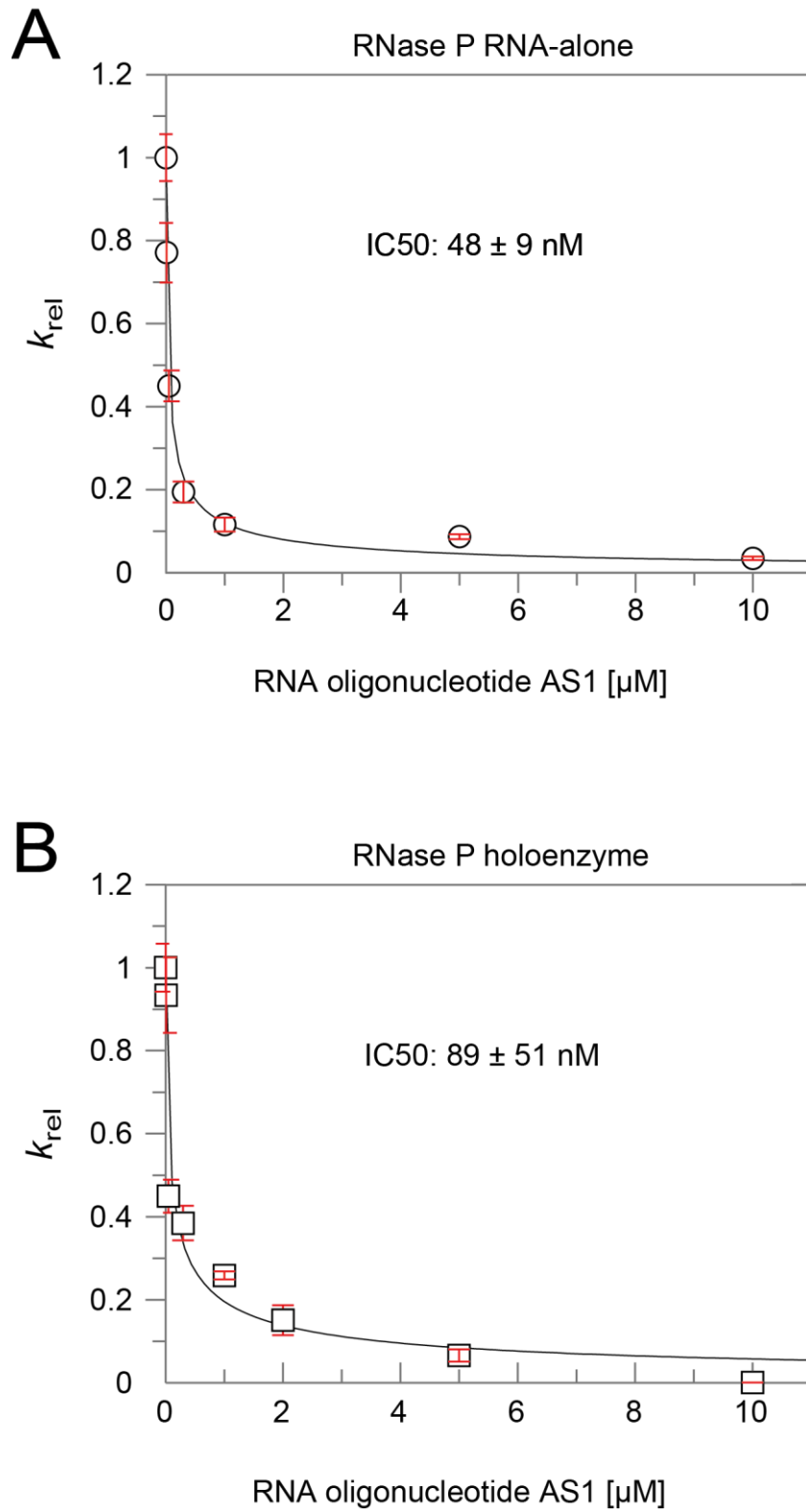
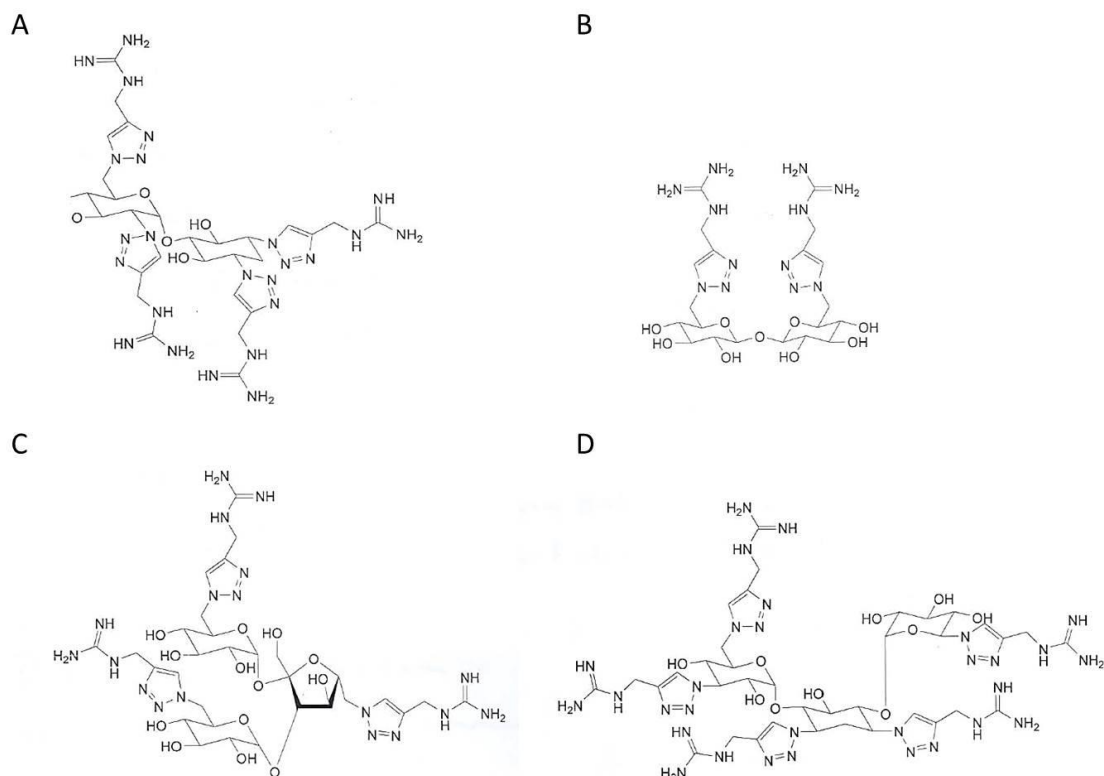


Fig. S3

### 3.1.2 Aminoglykoside

Aminoglykoside und Aminoglykosid-Derivate sind aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung bereits seit längerem Gegenstand der Forschung, mit dem Ziel, ihre Wirkungsweise auf molekularer Ebene zu verstehen.<sup>61,62</sup> Zwei sehr prominente Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Neomycin und Kanamycin, deren bakteriostatische Wirkung hauptsächlich auf ihrer Interaktion mit dem Ribosom beruht. Zudem wurden Derivate der beiden Antibiotika auch als Inhibitoren der bakteriellen RNase P-Reaktion charakterisiert.<sup>40</sup> Eine Interferenz mit der RNase P-Reaktion kann im Fall von Aminoglykosiden entweder durch Bindung an die P RNA oder an das Substrat, die Prä-tRNA, zustande kommen. Für eine pharmazeutische Anwendung wäre eine möglichst spezifische Bindung an die bakterielle P RNA wünschenswert, da sich bakterielle RNase P-Enzyme architektonisch substantiell von der humanen RNase P unterscheiden. Würde die Bindung jedoch hauptsächlich an die (Prä-) tRNA erfolgen, wären bei pharmakologischer Anwendung sehr wahrscheinlich toxische Nebenwirkungen zu erwarten, da sich tRNA-Moleküle in Bakterien und Eukaryonten praktisch nicht unterscheiden, was die Eignung als potentiellles Arzneimittel in Frage stellen würde. Allerdings wurde kürzlich berichtet, dass eine unspezifische Bindung von Aminoglykosiden sowohl auf P RNA- als auch auf tRNA-Ebene sehr wahrscheinlich ist.<sup>41</sup>

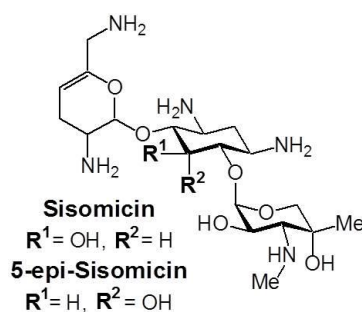
Im Rahmen einer Abschlussarbeit (eigene Masterarbeit, angefertigt in der AG Prof. Hartmann, Philipps-Universität Marburg) wurden verschiedene Aminoglykosid-Derivate (zur Verfügung gestellt durch Prof. Westermann, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Natur- und Wirkstoffsynthese, Halle) getestet, die teilweise eine Inhibition der RNase P-Reaktion zeigten. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine genauere kinetische und mechanistische Charakterisierung dieser Verbindungen durchgeführt werden.



**Abbildung 9:** Übersicht über die verwendeten Aminoglykosid-Derivate mit endständigen Guanidinium-Gruppen. Sie entstammen verschiedenen Grundstrukturen. (A, YSA 370) aus Neamin, vier Guanidinium-Gruppen. (B, YSA 376) aus Trehalose, zwei Guanidinium-Gruppen. (C, YSA 380) aus Melezitose, drei Guanidinium-Gruppen. (D, YSA 384) aus Kanamycin, fünf Guanidinium-Gruppen.

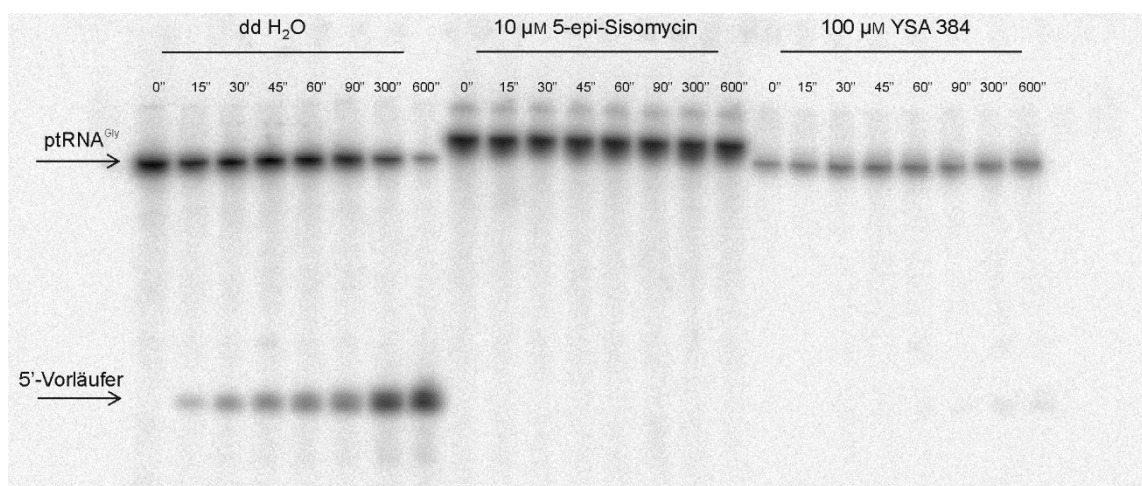
Die Verbindungen sind von Neamin, Kanamycin, Melezitose und Trehalose abgeleitet. Es handelt sich dabei um vier (amino)glykosidische Grundstrukturen, die eine unterschiedliche Anzahl an Guanidinium-Gruppen präsentieren (siehe Abbildung 9). Guanidinium-Gruppen liegen in wässriger Lösung bei neutralem pH in der Regel in protonierter Form vor.<sup>63</sup> Dies erhöht die Affinität zur polyanionisch vorliegenden RNA. Als Positivkontrolle wurde 5-epi-Sisomycin verwendet (siehe Abbildung 10). Von dieser Verbindung ist bekannt, dass es sich um einen sehr starken tRNA-Binder handelt. Maßgeblich für die starke Affinität scheint die Epimerisierung an der 5'-Position zu sein, die die Affinität im Vergleich zu Sisomycin um den Faktor ~176 erhöht.<sup>64</sup>

In ersten kinetischen Experimenten (eigene Masterarbeit) mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zeigten die beiden Verbindungen YSA 370 und YSA 384 moderate inhibitorische Effekte. YSA 376 und YSA 380 zeigten keinen Einfluss auf die Prä-tRNA-Prozessierung.



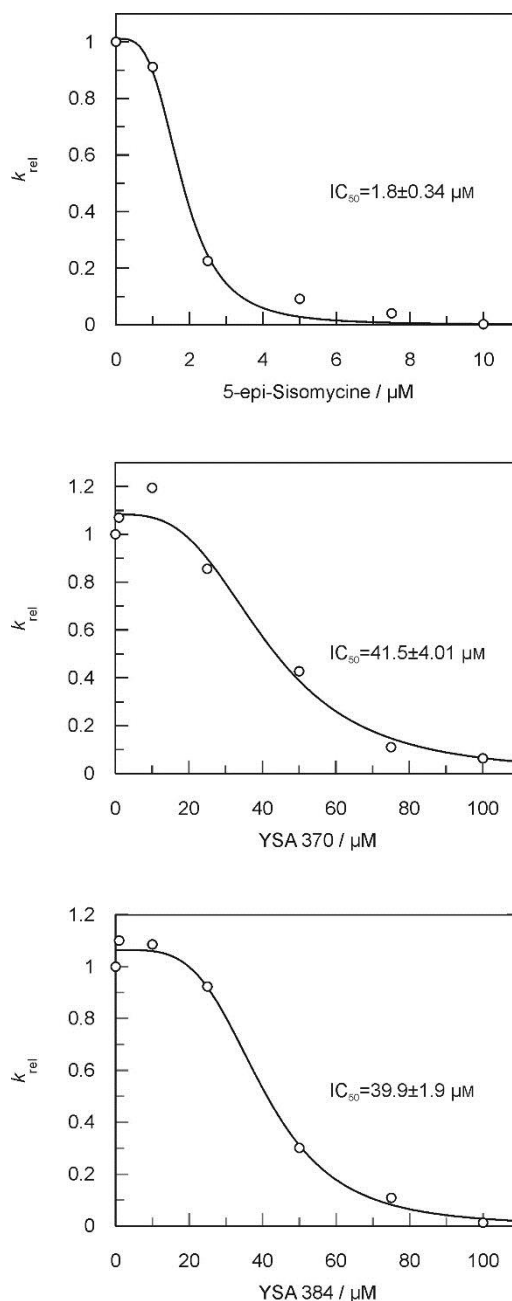
**Abbildung 10:** Strukturformel von Sisomicin bzw. 5-epi-Sisomicin. Die Position der Epimerisierung ist durch die Reste  $R^1$  und  $R^2$  gekennzeichnet.

Aus diesem Grund wurden in den hier vorgestellten Experimenten insbesondere YSA 370 und YSA 384 weiter untersucht. Als Positivkontrolle für eine bekannte starke tRNA-Interaktion wurde 5-epi-Sisomicin verwendet.



**Abbildung 11:** Denaturierende PAGE-Analyse der RNase P-Kinetik mit (5-epi-Sisomicin und YSA 384) sowie ohne (=dd H<sub>2</sub>O) Inhibitor. Man kann eine deutliche Inhibition der Prozessierung beobachten. Interessant ist auch die signifikante Retardierung in den Spuren, die 5-epi-Sisomicin enthalten. Offenbar ist der resultierende Komplex selbst unter denaturierenden Bedingungen stabil.

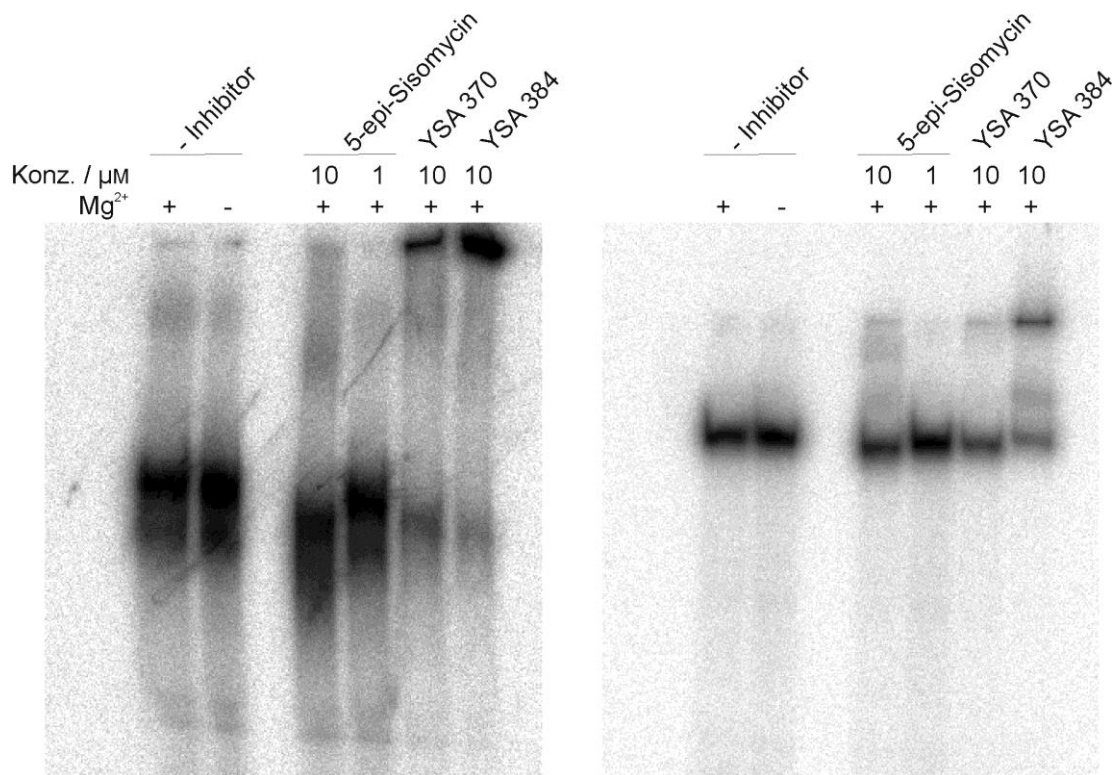
5-epi-Sisomicin bindet so stark an Prä-tRNA, dass der resultierende Komplex selbst auf einem denaturierenden PAA-Gel nicht aufgelöst werden kann (siehe Abbildung 11). Eine Variation der Inhibitorkonzentration in der durch *B. subtilis* RNase P katalysierten Prozessierungsreaktion (siehe Abbildung 12) ergab IC<sub>50</sub>-Werte im mikromolaren Bereich (5-epi-Sisomicin IC<sub>50</sub> = 1.8 ± 0.34 μM, YSA 370 IC<sub>50</sub> = 41.5 ± 4.01 μM, YSA 384 IC<sub>50</sub> = 39.9 ± 1.9 μM).



**Abbildung 12:** Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte für die verschiedenen Verbindungen. Es ergaben sich folgende Werte: 5-epi-Sisomycin:  $IC_{50} = 1.8 \pm 0.34 \mu\text{M}$ , YSA 370:  $IC_{50} = 41.5 \pm 4.01 \mu\text{M}$ , YSA 384:  $IC_{50} = 39.9 \pm 1.9 \mu\text{M}$ ;  $k_{rel}$  bezeichnet die auf die Reaktion ohne Inhibitor normierte Ratenkonstante ( $k_{obs}$  inhibiert/  $k_{obs}$  uninhibiert).

Bei den Untersuchungen stellte sich die weiterführende Frage, ob die Inhibition hauptsächlich durch Interaktion mit der P RNA- oder Prä-tRNA zustande kommt. Dazu wurden EMSA-Experimente mit nativen PAA-Gelen durchgeführt (Abbildung 13). Für den Fall einer signifikanten Affinität der untersuchten Verbindung zur entsprechenden Nukleinsäure würde man in diesem System einen Laufhöhenunterschied im Vergleich zur Negativkontrolle erwarten. In der Tat ließ sich für alle Verbindungen eine Affinität sowohl zu P RNA als auch zur Prä-tRNA beobachten. Im Fall von 5-epi-Sisomycin wanderte der beobachtete Komplex

schneller auf einem nativen Gel als die Referenz, was für einen geringeren hydrodynamischen Radius und damit für eine konformative Änderung in Richtung kompakterer Strukturen des Komplexes spricht. Im Fall von YSA 370 und YSA 384 wanderte der resultierende Komplex im Gel langsamer als die Referenz. Insbesondere im Fall der P RNA war der erhaltene Komplex nicht in der Lage, effizient in das Gel einzuwandern. Dies spricht für eine induzierte Aggregation der Nukleinsäuren in den Geltaschen.



**Abbildung 13:** Native PAGE-Analyse der P RNA- (links, 7.5% native PAGE) und Prä-tRNA-Komplexe (rechts, 20% native PAGE). Die Komplexbildung der RNAs mit den Aminoglykosid-Liganden verursacht deutliche Unterschiede in der Laufhöhe. Im Fall von 5-epi-Sisomycin erfolgt eine Verschiebung nach unten, während bei den Verbindungen YSA 370 und YSA 384 eine Retardierung zu beobachten ist. Hier aggregiert insbesondere im Fall der P RNA ein Großteil der Komplexe in der Geltasche.

Man kann die Ergebnisse dieses Projekts folgendermaßen zusammenfassen: Es konnten neuartige Aminoglykosid-Derivate charakterisiert werden, die eine signifikante Inhibition der RNase P-Reaktion zeigen. Bisher war dies nur für Neomycin B-Derivate bzw. Kanamycin B bekannt.<sup>38,40</sup> Als effizienteste Verbindung stellte sich das als Positivkontrolle verwendete 5-epi-Sisomycin heraus ( $IC_{50} = 1.8 \pm 0.34 \mu M$ ). Aber auch die Neamin- und Kanamycin-Derivate zeigten eine deutliche Inhibition (YSA 370:  $IC_{50} = 41.5 \pm 4.01 \mu M$ , YSA 384:  $IC_{50} = 39.9 \pm 1.9 \mu M$ ). Eine native PAA-Gel-Analyse zeigte eine Wechselwirkung der Verbindungen sowohl auf P RNA- als auch auf Prä-tRNA-Ebene. Bemerkenswert dabei ist, dass die Wechselwirkung mit 5-epi-Sisomycin zu einer erhöhten Wanderungsgeschwindigkeit im



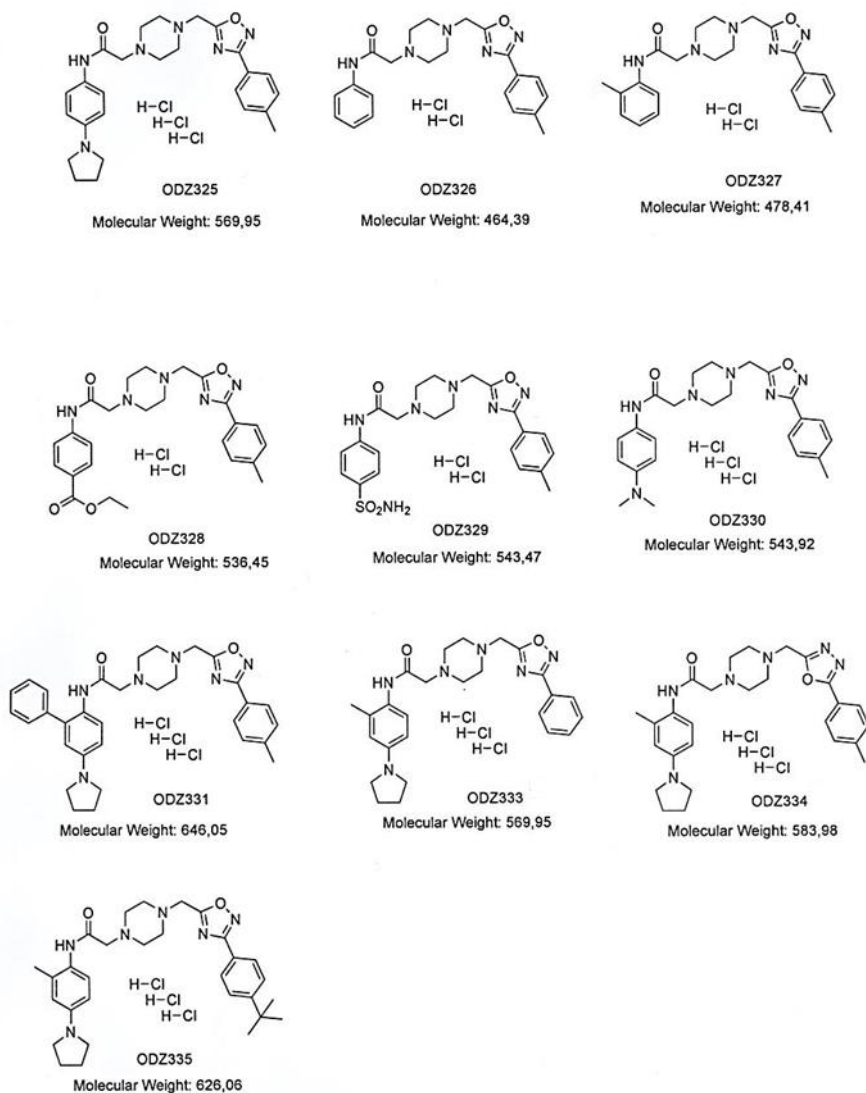
nativen Gel führte, während die Wechselwirkung mit YSA 370 und YSA 384 eine Aggregation der RNA-Spezies in den Geltaschen bewirkte. Dies spricht für einen deutlichen Unterschied in der Art der Wechselwirkung. Da der hydrodynamische Radius der RNA:5-epi-Sisomycin-Spezies reduziert wird (schnellere Migration), scheint die Wechselwirkung hauptsächlich auf intramolekularen Kontaktflächen zu beruhen, die bei beiden RNAs zu einer Kompaktierung der Konformation führen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Röntgenstruktur eines Komplexes aus tRNA und Neomycin B.<sup>64</sup> Der Befund, dass der RNA:5-epi-Sisomycin-Komplex nicht unter denaturierenden Bedingungen aufgelöst werden kann, könnte mit einer möglichen Neutralisierung bzw. Abschirmung negativer Ladungen unter diesen Bedingungen erklärt werden.

Im Gegensatz dazu spricht die Aggregation der RNA-Spezies durch Interaktion mit guanidinylierten Aminoglykosiden für die Vermittlung intermolekularer Wechselwirkungen, wahrscheinlich durch die endständigen Guanidinium-Gruppen. Zudem scheint eine gewisse Abhängigkeit der Affinität bzw. Inhibitionsstärke zur Anzahl der Guanidiniumgruppen vorzuliegen. So konnte für YSA 376 (zwei Guanidiniumgruppen) und YSA 380 (drei Guanidiniumgruppen) keine Inhibition beobachtet werden (Masterarbeit Dennis Walczyk, Philipps-Universität Marburg). Erst für die Verbindung mit vier endständigen Guanidiniumgruppen (YSA 370) war eine Inhibition zu beobachten. Korrelierend zu diesem Befund zeigt YSA 384 (fünf Guanidiniumgruppen) eine leicht stärkere Inhibition als YSA 370. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Verbindung YSA 384 ein Kanamycin-Derivat ist und hier eine effiziente Inhibition der RNase P-Reaktion zeigt, während man dies zumindest für Kanamycin A nicht beobachten kann. Kanamycin B hingegen zeigt eine deutliche Inhibition der RNase P-Reaktion.<sup>40</sup> Diese Diskrepanz kann vermutlich mit dem Vorhandensein protonierbarer endständiger Amine im Fall von Kanamycin B erklärt werden.

### 3.1.3 Heterozyklen

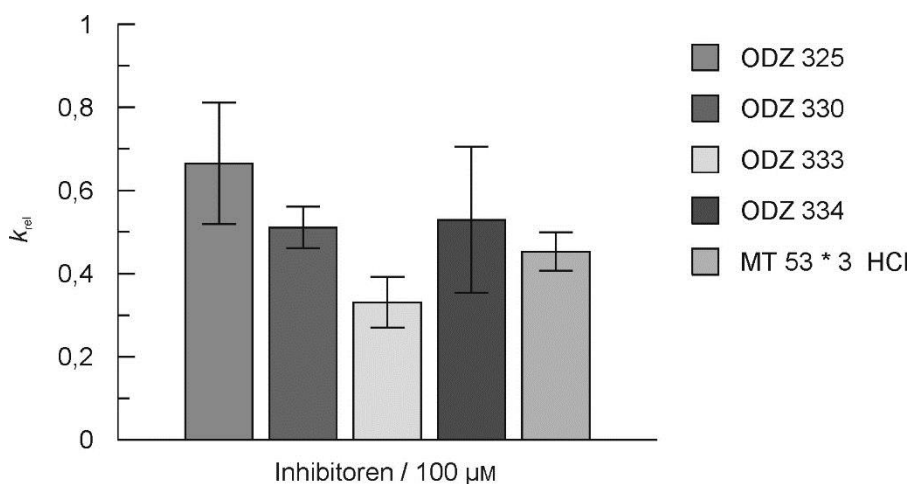
Das P Protein der bakteriellen RNase P ist hauptsächlich für die Bindung des 5'-Vorläufers der Prä-tRNA verantwortlich (siehe 1.1.1 Aufbau und Struktur der bakteriellen RNase P). Obwohl die RNA-Komponente der RNase P das katalytisch aktive Strukturelement ist, ist das P Protein *in vivo* absolut essentiell. Eine Möglichkeit die RNase P-Reaktion zu inhibieren, sind daher organische Moleküle, die affin an das P Protein binden und somit eine P Protein:5'-Vorläufer-Interaktion unterbinden (siehe 1.1.3 Inhibitionsmöglichkeiten der bakteriellen RNase P).

Um entsprechende Verbindungen zu identifizieren, wurde eine bioinformatische Vorhersage (*Docking*) durchgeführt. Auf Basis der Kristallstruktur des P Proteins aus *B. subtilis* wurden eine Reihe heterozyklischer Verbindungen gefunden, für die eine hohe Affinität auf das P Protein vorhergesagt wurde.<sup>31</sup> Alle diese Moleküle sind in der ZINC-Datenbank hinterlegt und wurden darüber als Reinstoff bezogen.<sup>65</sup> Diese Verbindungen wurden soweit möglich in DMSO gelöst und im Rahmen einer Abschlussarbeit (eigene Masterarbeit; Titel: Analyse von Inhibitoren der bakteriellen RNase P aus *B. subtilis*) kinetisch analysiert. Für alle untersuchten Verbindungen konnte dabei eine Inhibition der RNase P-Reaktion beobachtet werden. Die Inhibition bewegte sich bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM im Bereich von 40-50% (bezogen auf die Ratenkonstante  $k_{\text{obs}}$ ) der nicht inhibierten Reaktion. Jedoch wurde bei Zugabe der Inhibitoren zum Reaktionsansatz eine deutliche Präzipitation beobachtet, vermutlich ausgelöst durch die starke Verdünnung der DMSO-Konzentration von 100% auf 1% Endkonzentration in der Prozessierungskinetik. Diese Beobachtung führte zu Unsicherheiten bei der Einschätzung der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition und warf zudem die Frage auf, ob die Präzipitation der Verbindungen unspezifische Inhibitionseffekte ausgelöst haben könnte. Aufgrund dieser Erwägungen wurden im Rahmen einer Kooperation (AG Prof. Dr. W. Diederich, Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg) entsprechende Hydrochlorid-Derivate der untersuchten Verbindungen synthetisiert, mit dem Ziel die Löslichkeit der Inhibitoren unter den Bedingungen der Prozessierungskinetik zu verbessern. Diese Hydrochlorid-Derivate (Abbildung 14) lagen zu Beginn dieser Arbeit vor, sodass das Projekt im Rahmen dieser Arbeit fortgeführt werden konnte.



**Abbildung 14:** Übersicht über die synthetisierten heterozyklischen Hydrochloride. Die Verbindungen ODZ326, ODZ327, ODZ328, ODZ329, ODZ331 und ODZ335 waren nicht wasserlöslich. Alle übrigen Verbindungen wurden kinetisch untersucht. Abbildung zur Verfügung gestellt von F. Ehlert, AG Prof. Dr. W. Diederich, Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg.

Einige dieser Verbindungen waren in Wasser löslich, so dass auf die Zugabe von DMSO verzichtet werden konnte. Auch hier kam es allerdings zu einer sichtbaren Präzipitation während der Vorbereitung der Experimente. In diesem Fall wurde die Präzipitation durch eine Änderung des pH-Wertes im Prozessierungsansatz ausgelöst. Nach Lösen der Verbindungen (in ddH<sub>2</sub>O ungepuffert) war ein pH-Wert von ca. 2-3 zu beobachten. Durch Zugabe der Inhibitor-Stammlösung in den Kinetikansatz (z.B. KN-Puffer pH 7.4) wurde offenbar eine pH-abhängige Löslichkeitsgrenze überschritten und es kam zu der beobachteten Präzipitation.

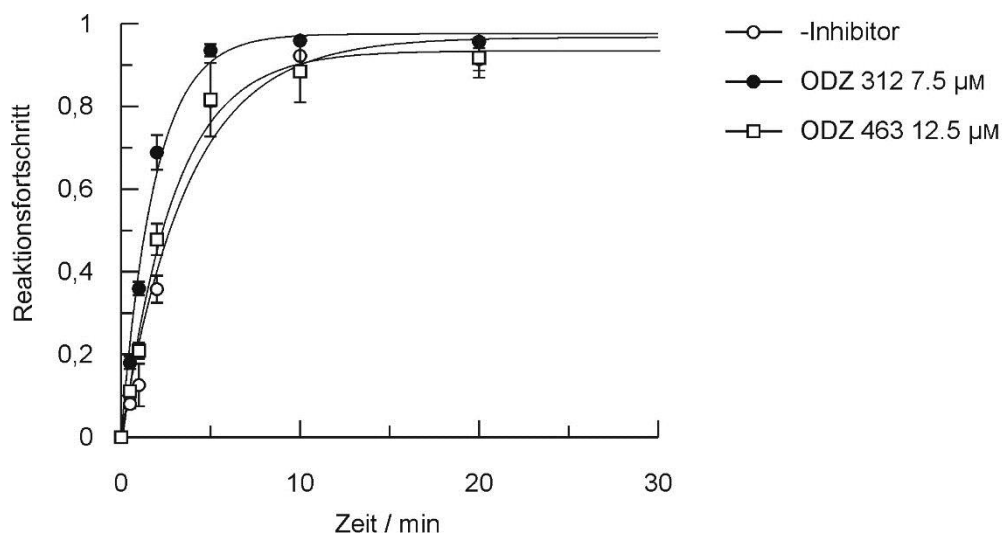


**Abbildung 15:** Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen der wasserlöslichen Inhibitoren;  $k_{rel}$  bezeichnet die anhand einer Vergleichsprobe ohne Inhibitor normierte Ratenkonstante ( $k_{obs} \text{ inhibiert} / k_{obs} \text{ uninhibiert}$ ). Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen den SEM dar. Reaktionsbedingungen: KN-Puffer, pH 7.4, 4.5 mM  $Mg^{2+}$ , 10 nM Holoenzym, 100 nM Prä-tRNA<sup>Gly</sup>.

Diese Interpretation der Beobachtungen wurde auch durch HPLC-Experimente gestützt (durchgeführt von Dr. F. Scheer und F. Ehlert, AG Prof. Dr. W. Diederich). Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten Inhibitoren (Abbildung 15) in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen (Soll-Konzentration 100 µM). Es wurden folgende Konzentrationen bestimmt: ODZ325 nicht nachweisbar, ODZ333 41 µM und MT53\*3HCl 10 µM.

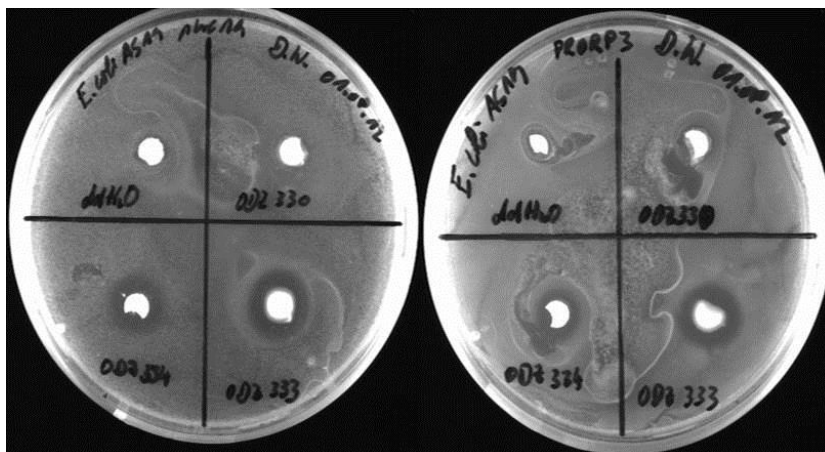
Um zu ermitteln, ob die Präzipitation und mithin die Konzentrationsunterschiede mit Pufferbestandteilen (KN-Puffer, siehe 2.1.6 Puffer und Lösungen) zusammenhingen, wurde die Zusammensetzung des Puffergemisches sukzessive um einzelne Komponenten reduziert. Es stellte sich heraus, dass der Grund für die Präzipitation der Inhibitoren die Pufferung der Lösung und damit die Fixierung des pH-Wertes war, d.h. die Verbindungen waren in saurer wässriger Lösung löslich und in neutraler Lösung unlöslich.

Aufgrund der beobachteten maximalen Konzentration der Inhibitoren wurde eine neue experimentelle Zusammensetzung der Kinetikansätze entwickelt. Dabei sollte eine möglichst geringe Verdünnung der Inhibitoren erfolgen und somit ein Präzipitieren vermieden werden. Die Verbindungen wurden in Reaktionspuffer gelöst (1% v/v DMSO), abzentrifugiert und anschließend ihre Konzentration per HPLC bestimmt. Der Reaktionsansatz wurde so konzipiert, dass die Hälfte des Gesamtvolumens für die Inhibitorlösung bestimmt war. Somit war eine vollständige Löslichkeit während der Reaktion garantiert, sodass unspezifische Nebeneffekte (pH-Verschiebung, Präzipitation) ausgeschlossen werden konnten. Allerdings waren unter diesen Bedingungen keine Inhibitionseffekte mehr zu beobachten (siehe Abbildung 16), was dafür spricht, dass die vorherigen Inhibitionseffekte unspezifisch bezüglich der RNase P-Reaktion waren.



**Abbildung 16:** Vergleich der RNase P-Kinetiken bei vollständiger Löslichkeit der Testverbindungen. In diesen Experimenten war kein signifikanter Inhibitionseffekt mehr zu beobachten. Reaktionsbedingungen: 10 nM *B. subtilis* RNase P-Holoenzym, 100 nM Prä-tRNA<sup>Gly</sup>, pH 6.5, 4.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 1% (v/v) DMSO, 50% (v/v) Inhibitorlösung.

Ebenfalls wurden im Rahmen einer Abschlussarbeit (eigene Masterarbeit; Titel: Analyse von Inhibitoren der bakteriellen RNase P aus *B. subtilis*) bakteriologische Hemmhoftests mit den heterozyklischen Verbindungen durchgeführt. Dabei zeigten die Verbindungen sowohl bei *E. coli* AS19 (mit Lipopolysaccharid-Defekt) als auch bei *B. subtilis* PY79 Hemmhöfe. Beim *E. coli* Wildtypstamm K12 mit intakter äußerer Zellmembran konnte dagegen keine Bildung von Hemmhöfen beobachtet werden. Um diese Effekte weiter zu untersuchen, wurden mit den vom Kooperationspartner synthetisierten Hydrochlorid-Derivaten ebenfalls entsprechende Hemmhoftests durchgeführt. In initialen Experimenten wurden erneut Hemmhöfe beobachtet. Um die RNase P-Spezifität zu überprüfen, wurden mit der RNase P PRORP3 aus *A. thaliana* Komplementationsexperimente durchgeführt (siehe Abbildung 17). Dazu wurde ein entsprechendes Plasmid in *E. coli* AS19-Zellen transformiert. Hätte die Inhibition der *E. coli* RNase P die Bildung der Hemmhöfe verursacht, wäre im Fall von *E. coli* AS19\_pUC19\_PRORP3 eine signifikant verringerte Hemmhofbildung zu erwarten gewesen. Allerdings führte die Komplementation nicht zu einer verringerten Hemmhofbildung, was für einen eher unspezifisch toxischen Effekt der Verbindungen spricht.



**Abbildung 17:** Spezifitätstest der Hemmhöfexperimente. Links: Hemmhöfe auf *E. coli* AS19\_pUC19. Rechts: Hemmhöfe auf *E. coli* AS19\_pUC19\_PRORP3. Es ist kein signifiaknter Unterschied zu beobachten. Die Hemmhöfbildung scheint daher nicht RNase P-spezifisch zu sein.

Die anfänglich getesteten Konzentrationen waren sehr hoch (10 mM). Daher wurden im Rahmen einer Konzentrationsreihe verschiedene Verdünnungen getestet. Bereits ab einer Konzentration  $< 10$  mM wurde die Hemmhöfbildung deutlich schwächer (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher sind die Verbindungen eher als unspezifisch zytotoxisch einzustufen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass bei Bakterien mit einer intakten Zellwand (*E. coli* K12 bzw. *E. coli* BW) keine Hemmhöfbildung beobachtet werden konnte.

Die im Rahmen dieses Teilprojekts vorgestellten Ergebnisse lassen wie folgt zusammenfassen: In bioinformatischen Vorarbeiten wurde eine Reihe heterozyklischer Verbindungen identifiziert, die in ersten Experimenten eine Inhibition der RNase P-Prozessierung zeigten. Aufgrund einer sichtbaren Präzipitation dieser Verbindungen wurde versucht, über die korrespondierenden Hydrochloride eine verbesserte Wasserlöslichkeit zu erreichen. Es zeigte sich jedoch, dass die hohe Wasserlöslichkeit der Verbindungen nur im deutlich sauren pH-Bereich (ca.  $\text{pH} \leq 3$ ) gewährleistet war. In Lösungen mit Pufferung im neutralen Bereich präzipitierten die Verbindungen ebenfalls. Die mit diesen Hydrochlorid-Derivaten beobachtete Inhibition (siehe Abbildung 15) wurde anschließend durch eine Überarbeitung des Reaktionsprotokolls auf ihre RNase P-Spezifität überprüft. Dabei wurde sichergestellt, dass es zu keiner Präzipitation oder Verschiebung des pH-Wertes kam, die Reaktion also in homogener Lösung durchgeführt wurde. In diesem Ansatz war keine signifikante Inhibition der RNase P-Reaktion mehr zu beobachten (Abbildung 16). Man kann also festhalten, dass es nur zu deutlichen Hemmeffekten kam, wenn entweder eine Präzipitation stattfand und/oder der pH-Wert abgesenkt wurde (die RNase P-Reaktion ist deutlich pH-abhängig, siehe auch 1.1.2 Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P).

Dass bei Ausschluss dieser beiden Phänomene keine Inhibition zu beobachten war, legt die Interpretation nahe, dass die ursprünglich gemessenen Hemmeffekte nicht auf eine spezifische Inhibition der Interaktion zwischen P Protein und 5'-Flanke der Prä-tRNA zurückzuführen sind, sondern auf unspezifische Effekte. Diese Schlussfolgerung geht mit der Beobachtung einher, dass in Kristallisationsexperimenten (sowohl Cokristallisation des *B. subtilis* P Proteins mit den Verbindungen als auch *Soaking* der Verbindungen in Kristalle des P Proteins) keine Differenzelektronendichte in der zentralen Furche des P Proteins gefunden werden konnte (persönliche Kommunikation Dr. H. Steuber, seinerzeit MarXtal, Philipps-Universität Marburg).



**Abbildung 18:** Mikroskopische Aufnahme eines Tropfens aus einem Kristallisationsansatz des P Proteins von *B. subtilis*. Die auf diese Weise gewonnenen Proteinkristalle wurden für Cokristallisations- und *Soaking*-Experimente mit ausgewählten Hydrochlorid-Derivaten verwendet. Allerdings konnte keine Differenzelektronendichte in Gegenwart der Liganden beobachtet werden.

Ebenso konnte im Rahmen eines *Thermal Shift Assays* (TSA) keine Affinität der Inhibitoren an das P Protein nachgewiesen werden. In diesen Experimenten (Daten nicht gezeigt) wurde zudem keine stabile Faltung des Proteins beobachtet. Dieser Befund steht durchaus mit der Literatur in Einklang. Dort wird das P Protein der bakteriellen RNase P als in Lösung partiell entfaltet beschrieben, dessen korrekte Tertiärstruktur stark vom Vorhandensein anionischer Liganden abhängig ist.<sup>21</sup>

Ein ähnliches Bild ergaben die durchgeführten *in vivo* Versuche zur bakteriellen Hemmhofbildung. Die beobachteten bakteriostatischen Effekte konnten nicht mit einer spezifischen RNase P-Inhibition in Einklang gebracht werden, da sich kein

Komplementationseffekt nachweisen ließ (Abbildung 17). Vielmehr sprechen die Ergebnisse eher für einen unspezifisch zytotoxischen Effekt der Verbindungen aufgrund ihrer hohen Konzentration.



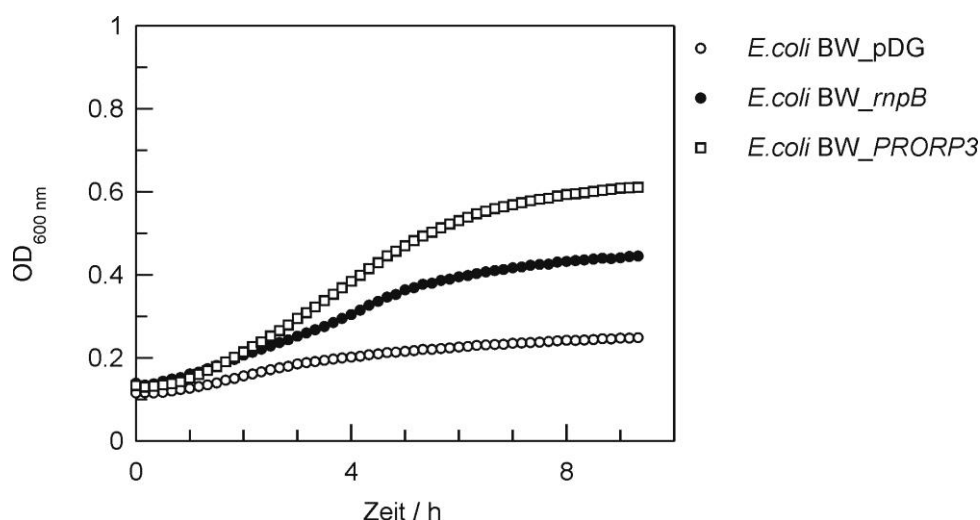
### 3.2 Ein Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung von RNase P-Inhibitoren

#### 3.2.1 Pilotexperimente und Miniaturisierung

Die Reduzierung von Antibiotikaresistenzen, unter anderem durch die Entwicklung neuer Antibiotika, ist eine der großen Herausforderungen für das Gesundheitswesen der Zukunft.<sup>61</sup> Die Vielzahl der Resistenzmechanismen macht dabei insbesondere resistenzbrechende Antibiotika notwendig. Aus diesem Grund stellt die Adressierung bisher ungenutzter Ziele eine interessante Strategie dar, um neue Antibiotika zu entwickeln, die nicht von den zurzeit vorherrschenden Resistenzen erfasst werden, welche durch Plasmide und Transposons horizontal zwischen Bakterien auch unterschiedlicher Arten übertragen werden.<sup>66</sup> Ein bisher nicht genutztes Ziel ist die bakterielle RNase P. Das Enzym erfüllt zwei wichtige Voraussetzungen eines Antibiotika-Targets besonders gut: das Enzym ist zum einen für das bakterielle Überleben essentiell und unterscheidet sich zum anderen in seinem strukturellen Aufbau signifikant von den humanen RNase P-Enzymen.<sup>31</sup> Der Komplementationsstamm *E. coli* BW sollte dazu genutzt werden, im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings nach spezifischen Inhibitoren der bakteriellen RNase P zu suchen. In diesem Stamm befindet sich das Gen für die endogene RNase P RNA (*rnpB*) unter Kontrolle des Arabinose-Promotor-Systems.<sup>52</sup> Liegt Arabinose im Nährmedium vor, kann der Bakterienstamm ungehindert wachsen. Die Substituierung von Arabinose durch Glucose als Kohlenstoffquelle führt zur Abschaltung der Expression des *rnpB*-Gens, was zur Folge hat, dass sich die Bakterien nicht mehr vermehren können, da durch den Mangel an maturierten, funktionalen tRNAs die Proteinbiosynthese zum Erliegen kommt. Transformiert man den Stamm *E. coli* BW jedoch mit einem Plasmid, auf dem die RNase P RNA kodiert ist, lässt sich das Bakterienwachstum wiederherstellen (Komplementation). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine bakterielle Komplementation auch mit strukturell völlig verschiedenen RNase P-Enzymen (z.B. PRORP aus *A. thaliana*) möglich ist.<sup>8</sup> Damit ergibt sich die Möglichkeit zu prüfen, ob eine beobachtete bakterielle Wachstumsinhibition spezifisch für die bakterielle RNase P ist. Lässt man verschiedene *E. coli* BW-Stämme (z.B. *E. coli* BW\_pDG [nur mit dem Leerplasmid transformiert], *E. coli* BW\_*rnpB* und *E. coli* BW\_PRORP3) unter Glucose-Bedingungen wachsen (Abwesenheit von Arabinose: die endogene RNase P ist deaktiviert), hängt das bakterielle Überleben vom transformierten Plasmid ab. Im Falle von *E. coli* BW\_pDG ist kein Weiterwachsen der Bakterien zu erwarten, während *E. coli* BW\_*rnpB* und *E. coli* BW\_PRORP3 überlebensfähig sind. Würde ein getesteter Inhibitor selektiv das Wachstum

des Stammes *E. coli* BW\_*rnpB* inhibieren, während *E. coli* BW\_PRORP3 unbeeinträchtigt bleibt, wäre das ein starkes Indiz für eine spezifische Inhibition der bakteriellen RNase P und somit ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines neuartigen Antibiotikums. Entsprechende Experimente wurden im Rahmen eines *Screens/Counterscreens* am FMP Berlin (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie) durchgeführt.

Aufgrund der gerätetechnischen Voraussetzungen der *Screening Unit* am FMP Berlin war es notwendig, einige kritische Parameter im Vorfeld zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die Experimente auch unter den Bedingungen eines Hochdurchsatzverfahrens verlässliche Daten generieren. Grundvoraussetzung für die Durchführung war die Verwendung von 384-well-Platten zum Aufnehmen der Wachstumskurven und das damit einhergehende verringerte Volumen der Bakterienkulturen. Zusätzlich war eine DMSO-Toleranz mit einer Endkonzentration von 0.5% (v/v) notwendig, da die Substanzbibliotheken der *Screening Unit* in DMSO gelöst vorliegen. Die dortigen Inkubationsvoraussetzungen limitierten die maximale Wachstumstemperatur auf 30°C und die Kulturen wurden ohne Schütteln inkubiert (es war also mit einer suboptimalen Sauerstoffversorgung zu rechnen). In initialen Experimenten erwies sich ein Volumen von 50 µL Nährmedium pro well als unzureichend und es konnte kein signifikantes Bakterienwachstum beobachtet werden. Durch eine Erhöhung auf 80 µL wurde dieses Problem gelöst, es konnte nun ein Bakterienwachstum sowie der erwartete Komplementationseffekt beobachtet werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Initiale Wachstumsversuche mit *E. coli* BW-Derivaten in 384-well-Platten bei 30°C ohne Schütteln in Gegenwart von 10 mM Glucose. Man kann deutlich ein (schwaches) Weiterwachsen der Negativkontrolle *E. coli* BW\_pDG erkennen.

Allerdings war unter diesen Bedingungen noch immer ein geringes Weiterwachsen der *E. coli* BW\_pDG-Kultur zu beobachten (ca. eine Verdoppelung, vermutlich ausgelöst durch

residuale Arabinose). Dies führte zu einem sehr schmalen statistischem Messfenster und dementsprechend zu einem verschlechtertem Z-Wert, der ein wichtiges Maß in Hochdurchsatz-*Screenings* darstellt.

### 3.2.2 Bedeutung des Z'-Faktors

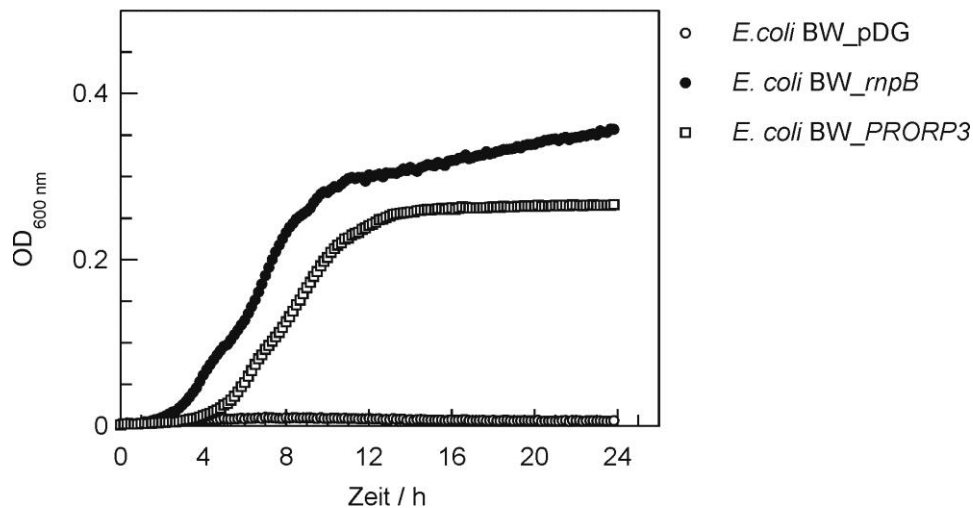
Der Z'-Faktor ist ein wichtiger Wert, um statistische Effekte im Rahmen von Hochdurchsatz-*Screenings* beurteilen zu können.<sup>67</sup> Er ist wie folgt definiert:

$$Z' - Faktor = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Wie zu erkennen ist, wird bei der Berechnung die Standardabweichung von Positiv- und Negativkontrolle ( $\sigma_p$  bzw.  $\sigma_n$ ) ins Verhältnis zu den entsprechenden Mittelwerten ( $\mu_p$  bzw.  $\mu_n$ ) gesetzt. Letztendlich erlaubt der Z'-Faktor eine Aussage darüber, ob ein Assay robust genug ist, um automatisiert relativ zu Positiv- und Negativkontrolle zwischen einem Treffer und Nicht-Treffer unterscheiden zu können. Theoretisch ist ein maximaler Z'-Faktor von 1 erreichbar (ein idealer Assay). Bewegt sich der Z'-Faktor zwischen 0.5 und 1, so spricht man noch immer von einem exzellenten Assay. Bei einem Wert von unter 0.5 wird die Interpretation der Daten bzw. die Unterscheidung Treffer/kein Treffer zunehmend schwierig. Werte kleiner als 0 sind nicht mehr interpretierbar.<sup>67</sup> Daher war ein Ziel der Pilotexperimente, einen möglichst hohen Z'-Faktor zu erreichen.

### 3.2.3 Optimierung

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, lag die initiale optische Dichte nach Inokulation der Wachstumskultur bereits in einem Bereich um den Wert 0.1. Um das Problem des relativ geringen Unterschieds zwischen Positiv- und Negativkontrolle zu lösen, wurden in einem weiteren Schritt die entsprechenden Vorkulturen nochmals 1:1000 verdünnt, um damit die Wachstumskulturen zu inokulieren (Start-OD<sub>600</sub> ~0.015). Dies resultierte in einem stark verbesserten Messfenster, ein signifikantes Weiterwachsen der Negativkontrolle war unter diesen Bedingungen nicht mehr zu beobachten (Abbildung 20).

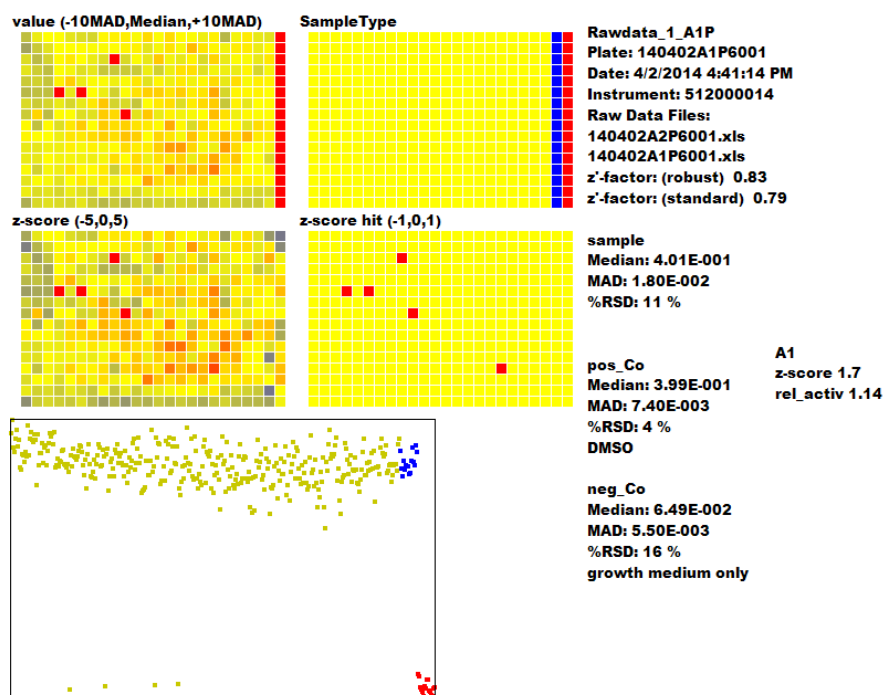


**Abbildung 20:** Initiale Wachstumsversuche mit *E. coli* BW-Derivaten in 384-well-Platten bei 30°C ohne Schütteln in Gegenwart von 10 mM Glucose. Durch Verwendung der verdünnten Inokulationskultur blieb das auslaufende Wachstum der Negativkontrolle *E. coli* BW\_pDG im Hintergrundbereich.

Aufgrund der nun erfüllten Voraussetzungen bezüglich Miniaturisierung und statistischer Robustheit wurde in anschließenden Experimenten ein Assaytransfer am FMP Berlin vorgenommen, um die Reproduzierbarkeit unter den dortigen Gegebenheiten zu prüfen und das HTS vorzubereiten.

### 3.2.4 Assaytransfer und Endpunkt-Messung

Es kristallisierte sich zunächst heraus, dass es nicht möglich war, von jeder getesteten 384-well-Platte Wachstumskurven aufzunehmen. Aufgrund der Größe der Substanzbibliothek hätten ca. 40 Platten parallel vermessen werden müssen. Daher wurde entschieden, stattdessen Endpunkt-Messungen nach einer Inkubation über Nacht durchzuführen. Man kann sehr gut erkennen, dass in diesem Fall ebenfalls ein ausreichend großes Messfenster vorhanden war, d.h. es war ein deutlicher Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle erkennbar. Die Z'-Faktor-Werte lagen dementsprechend in einem sehr guten Bereich von ~0.7-0.8 (Abbildung 21).

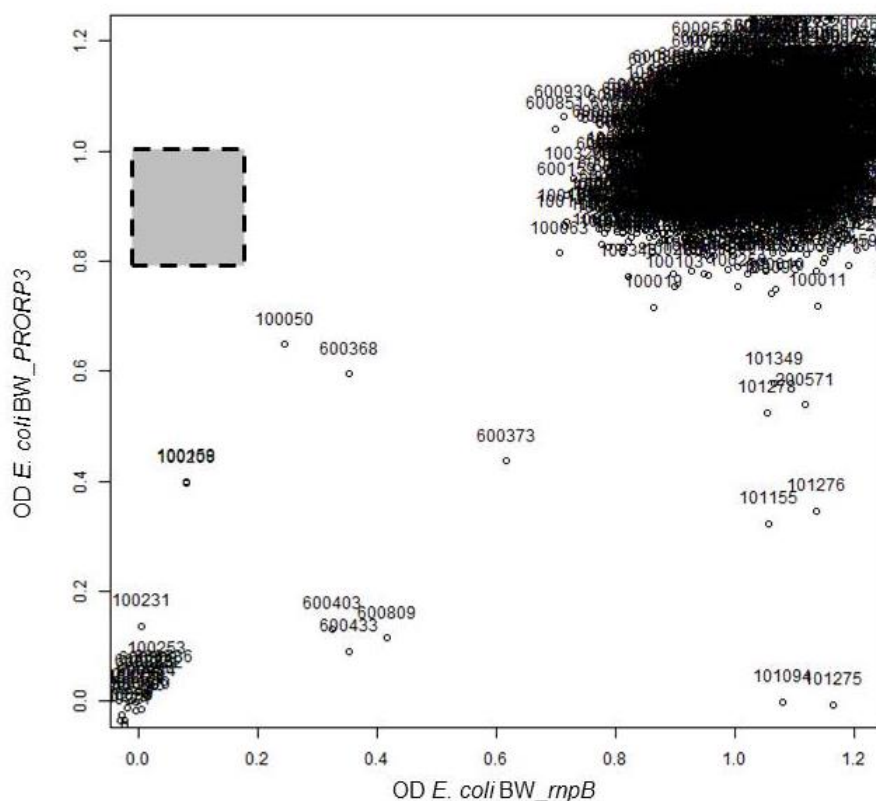


**Abbildung 21:** Beispiel einer Endpunkt-Messung im 384-well-Plattenformat. In den oberen Quadranten ist das Schema einer 384-well-Platte zu erkennen. Rot steht für die Negativkontrolle, blau für die Positivkontrolle. Im unteren Fenster sind die relativen optischen Dichten der mit Testsubstanzen versetzten *E. coli* BW\_rnpB-Kulturen, sowie von Positiv- und Negativkontrolle (*E. coli* BW\_rnpB und BW\_pDG in Gegenwart von 10 mM Glucose ohne Testsubstanzen) zu erkennen. Bei einem grünen Punkt auf dem Niveau der Negativkontrolle lag eine Wachstumsinhibition und somit ein primärer Treffer vor. Abbildung zur Verfügung gestellt durch Dr. Martin Neuenschwander, *Screening Unit*, FMP Berlin.

Mit dem erfolgreichen Assaytransfer war die Grundlage geschaffen, um mit dem Primär-Screen zu beginnen. Da im Rahmen des Primär-Screens nicht nur ein Screen sondern gleichzeitig auch ein Counterscreen (also *E. coli* BW\_rnpB vs. *E. coli* BW\_PRORP3) durchgeführt werden sollte (und damit prinzipiell der Aufwand an Arbeitszeit und Material nochmals deutlich erhöht wurde), war es durchaus sinnvoll vor Beginn des Primär-Screens umfangreiche Vorexperimente, sprich Optimierung und Assay-Transfer, durchzuführen.

### 3.2.5 Primär-Screen

Während des Primär-Screens wurde die gesamte Substanzbibliothek (ca. 40,000 Substanzen) des FMP Berlin als Screen/Counterscreen gegen *E. coli* BW\_rnpB bzw. *E. coli* BW\_PRORP3 vermessen. Dabei wurden insgesamt 93 primäre Treffer identifiziert, die mindestens einen der beiden untersuchten Bakterienstämme signifikant hemmten.



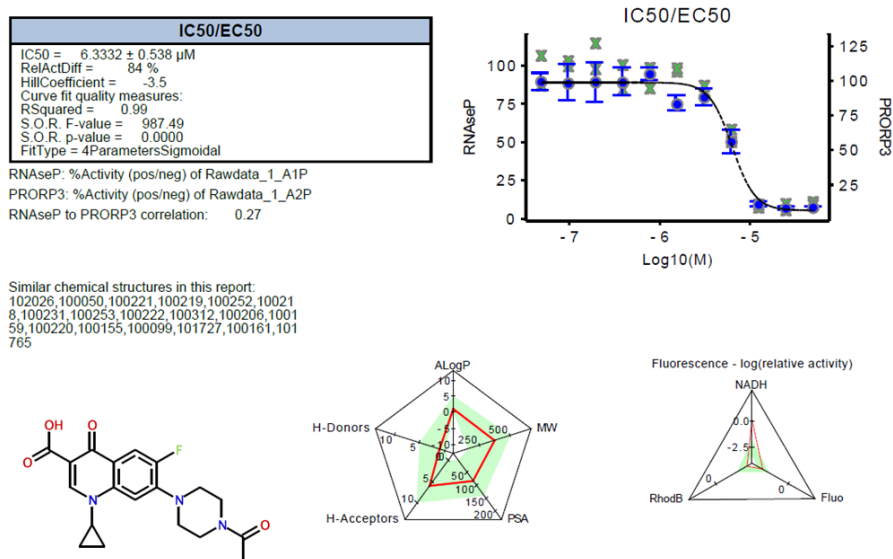
**Abbildung 22:** Ergebnisse des *Screens/Counterscreens* für *E. coli* BW\_rnpB und BW\_PRORP3 (basierend auf Endpunktmessungen der optischen Dichte). Ein für bakterielle RNase P spezifischer Inhibitor konnte nicht identifiziert werden. Er hätte das Wachstum von *E. coli* BW\_rnpB vollständig hemmen und das von *E. coli* BW\_PRORP3 unbeeinflusst lassen sollen (grau unterlegter Bereich). Zu sehen sind hier die optischen Dichten der Vergleichskulturen für jeden untersuchten Inhibitor (mit der jeweiligen Identifikationsnummer gekennzeichnet). Abbildung zur Verfügung gestellt durch Dr. Martin Neuenschwander, *Screening Unit*, FMP Berlin.

Bei näherer Analyse stellte sich jedoch heraus, dass kein spezifischer Inhibitor der bakteriellen RNase P identifiziert werden konnte. Der überwiegende Teil der untersuchten Verbindungen zeigte keinen nennenswerten Effekt auf das bakterielle Wachstum (Bereich oben rechts in Abbildung 22). Die Verbindungen, die eine effiziente Inhibition zeigten, waren überwiegend Varianten bereits bekannter Antibiotika (z.B. stellt Substanz 100050 ein Fluorchinolon-Derivat dar).

### 3.2.6 Validierungs-Screen

Um die Effekte der initialen Treffer voneinander abzugrenzen und etwaige konzentrationsabhängige Unterschiede herauszuarbeiten, wurden für beide Stämme Validierungs-Screens durchgeführt. Dazu wurden erneut Endpunktmessungen des bakteriellen Wachstums durchgeführt. Die Inhibitoren wurden dazu in einer Verdünnungsreihe bei

verschiedenen Konzentrationen vermessen. Als Ergebnis wurden eine IC<sub>50</sub>-Kurve für jede getestete Verbindung erhalten (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Beispiel der erhaltenen Resultate im Validierungs-Screen. Oben rechts ist die IC<sub>50</sub>-Bestimmung für *E. coli* BW\_rnpB (blau) bzw. *E. coli* BW\_PRORP3 (grün) zu erkennen. Unten sind die Strukturformel der entsprechenden Verbindung und ihre charakteristischen Parameter abgebildet. Abbildung zur Verfügung gestellt durch Dr. Martin Neuenschwander, Screening Unit, FMP Berlin.

Bei keiner der getesteten Verbindungen wurde eine spezifische (bzw. konzentrationsabhängige) Inhibition des *E. coli* BW\_rnpB-Stamms beobachtet.

### 3.2.7 Diskussion

Wir waren in der Lage, ein bakteriologisches Hochdurchsatz-Screening zu etablieren. Die entsprechenden statistischen Parameter lagen in einem sehr guten Bereich (siehe z.B. Abbildung 21: Z' ~0.8). Im initialen Primär-Screen wurden 93 Treffer identifiziert, die das Bakterienwachstum signifikant hemmten. Allerdings erwies sich keine der Substanzen als spezifischer Inhibitor der bakteriellen RNase P aus *E. coli*. Stattdessen waren die meisten Verbindungen Derivate bereits bekannter Antibiotika (z.B. Fluorchinolone und  $\beta$ -Lactame) oder generell toxische Substanzen. Nichtsdestotrotz zeigen diese Treffer, dass der entwickelte Ansatz prinzipiell funktional ist. Die identifizierten Antibiotika-Derivate repräsentierten lediglich ~0.25 % der Substanzbibliothek, was für eine sehr gute Spezifität des Assays spricht.

Die Gründe dafür, dass in der Substanzbibliothek kein potenter RNase P-Inhibitor identifiziert wurde, können vielfältig sein. Zum einen besteht die offensichtliche Möglichkeit, dass keine entsprechende Substanz in der Bibliothek enthalten ist. Weiterhin ist denkbar, dass eine entsprechende Substanz in der Bibliothek enthalten ist, aber nicht in der Lage ist, die bakterielle Zellwand effektiv zu durchdringen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, würde es sich anbieten, das Verfahren mit einem (noch zu konstruierenden) *E. coli*-Stamm zu wiederholen, bei dem aufgrund eines Zellwanddefekts die Permeabilität erhöht ist (z.B. ein Derivat des Stamms *E. coli* AS19) und die endogene RNase P unter der Kontrolle des Arabinose-Promotors exprimiert wird. Die Forschungsgruppe um K. Lewis identifizierte beispielsweise ein neuartiges Peptidantibiotikum, das lediglich gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien mit einem Zellwanddefekt aktiv ist.<sup>68</sup> Generell scheinen Gram-negative Bakterien ein schwierigeres *Target* zu sein, was nicht nur an der erschwerten Aufnahme der Substanzen in die Bakterienzelle liegt, sondern auch an der erhöhten Tendenz zur Resistenzbildung aufgrund von Effluxpumpen.<sup>66</sup>

Die Größe der verwendeten Substanzbibliothek lag mit ~40,000 Verbindungen in einem mittleren Bereich. Gerade in der pharmazeutisch-industriellen Forschung existieren weitaus größere Substanzbibliotheken. Denkbar wäre ein Hochdurchsatz-*Screening* mit dem hier entwickelten Verfahren im Rahmen entsprechender Kooperationen unter Verwendung umfangreicherer Substanzbibliotheken.



### 3.3 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus *A. thaliana*

Die Ergebnisse dieses Kapitel wurden in Form eines Manuskriptes zusammengefasst (*Analysis of the cleavage mechanism by protein-only RNase P using precursor tRNA substrates with modifications at the cleavage site; in revision*, Stand: 15.08.2016). Darin wurde die Kinetik und Spaltstellenselektion durch das Enzym PRORP3 aus *Arabidopsis thaliana* (*AtPRORP3*) analysiert, indem Vorläufer tRNAs (ptRNAs) mit individuellen Modifikationen an der kanonischen Spaltstelle verwendet wurden (Rp- oder Sp-Phosphorothioate oder 2'-Deoxy-, 2'-Fluoro-, 2'-Amino- oder 2'-O-Methyl-Substitutionen). Wir konnten einen kleinen aber robusten *rescue*-Effekt der Sp-Phosphorothioat-modifizierten ptRNA in der Gegenwart von thiophilen  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen beobachten. Dies ist konsistent mit einer Metall-Ionen-Koordination zum (pro-) Sp-Sauerstoff während der Katalyse. Sp-Phosphorothioate oder 2'-Deoxy-, 2'-Amino- oder 2'-O-Methyl-Substitutionen führten hauptsächlich zu einer Ausweichspaltung am nächsten unmodifizierten Phosphodiester in 5'-Richtung. Unsere Ergebnisse sind in Einklang mit einem 2'-OH Substituenten an nt-1, der in einer Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Funktion eingebunden ist. Im Gegensatz zur bakteriellen RNase P war *AtPRORP3* in der Lage die kanonische und die nicht-kanonische Spaltstelle mit vergleichbarer Effizienz zu nutzen (korrespondierend mit einer reduzierten Spaltgenauigkeit), das heißt die zwei Spaltungswege scheinen weniger voneinander abhängig zu sein als im bakteriellen RNA-basierten System.

## **Analysis of the cleavage mechanism by protein-only RNase P using precursor tRNA substrates with modifications at the cleavage site**

Dennis Walczyk<sup>1</sup>, Markus Gößringer<sup>1</sup>, Walter Rossmanith<sup>2</sup>, Timofei S. Zatsepin<sup>3,4</sup>, Tatiana S. Oretskaya<sup>3</sup>, Roland K. Hartmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pharmaceutical Chemistry, Philipps-University Marburg, 35037 Marburg, Germany

<sup>2</sup> Center for Anatomy & Cell Biology, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

<sup>3</sup> Chemistry Department and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, 3 Nobel street, Innovation Center “Skolkovo”, 143026 Skolkovo, Russia

Correspondence to Roland K. Hartmann: Institute of Pharmaceutical Chemistry, Philipps-University Marburg, Marbacher Weg 6, 35037 Marburg, Germany.  
roland.hartmann@staff.uni-marburg.de

### **Key Words**

tRNA processing by protein-only RNase P PRORP3 from *Arabidopsis thaliana*; catalytic mechanism; phosphorothioate and 2'-ribose modifications at the canonical cleavage site

## Abstract

Ribonuclease P (RNase P) is the enzyme that endonucleolytically removes 5'-precursor sequences from tRNA transcripts in all domains of life. RNase P activities are either ribonucleoprotein (RNP) or protein-only (PRORP) enzymes, raising the question about the mechanistic strategies utilized by these architecturally different enzyme classes to catalyze the same type of reaction. Here we analyzed the kinetics and cleavage-site selection by PRORP3 from *Arabidopsis thaliana* (AtPRORP3) using precursor tRNAs (pre-tRNAs) with individual modifications at the canonical cleavage site, either Rp- or Sp-phosphorothioate, or 2'-deoxy, 2'-fluoro, 2'-amino or 2'-O-methyl substitutions. We observed a small but robust rescue effect of Sp-phosphorothioate-modified pre-tRNA in the presence of thiophilic Cd<sup>2+</sup>-ions, consistent with metal ion coordination to the (pro-)Sp-oxygen during catalysis. Sp-phosphorothioate, 2'-deoxy, 2'-amino and 2'-O-methyl modification redirected cleavage mainly to the next unmodified phosphodiester in the 5'-direction. Our findings are in line with the 2'-OH substituent at nt -1 being involved in an H bonding acceptor function. In contrast to bacterial RNase P, AtPRORP3 was found to be able to utilize the canonical and upstream cleavage site with similar efficiency (corresponding to reduced cleavage fidelity), thus the two cleavage pathways appear less interdependent than in the bacterial RNA-based system.

## Introduction

Transfer RNAs (tRNAs) are transcribed as non-functional precursors (pre-tRNAs) with flanking sequences at their 5'- and 3'-ends. Ribonuclease P (RNase P) is the enzyme responsible for their endonucleolytic 5'-end maturation, a process indispensable for cell viability [1]. In Bacteria RNase P consists of a catalytically active RNA subunit (P RNA, ~400 nt) and a small protein subunit (P protein, ~13 kDa) that interacts with nucleotides in the pre-tRNA 5'-leader [1,2]. However, RNase P architecture differs significantly in the three domains of life: archaeal RNase P consists of an RNA and 4-5 proteins and eukaryal RNase P of an RNA and 9-10 proteins. [1,2-4] The eukaryal RNase P family became even more diverse with the discovery of RNase P in human mitochondria, which turned out to consist of three protein subunits but lacking any RNA component [5]. Subsequently, more simple single-polypeptide enzymes homologous to the catalytic subunit of human mitochondrial RNase P were identified in the land plants and trypanosomatids [5-8] Such protein-only RNase P enzymes, termed PRORPs were recently shown to be widespread among eukarya, being present in four of the five eukaryal supergroups [9].

As RNA-based and protein-only RNase P enzymes, despite their fundamentally different architectures, catalyze identical reactions, a comparison how the two classes of enzymes respond to specific modifications at the cleavage site is expected to provide valuable mechanistic insight. Previous studies provided evidence that PRORP enzymes differ mechanistically from bacterial RNase P [10–13]. For bacterial RNase P, an *Rp*-phosphorothioate modification at the canonical cleavage site decreased the rate constant for  $Mg^{2+}$ -dependent catalysis by at least three orders of magnitude. However, efficient cleavage could be largely restored by addition of thiophilic  $Cd^{2+}$  ions, indicating that inner-sphere metal ion coordination of the (pro-)*Rp*-oxygen occurs in the transition state of phosphodiester hydrolysis [14,15]. Likewise, cleavage of pre-tRNA with an *Rp*-phosphorothioate modification at the canonical site could be moderately rescued at this site by addition of  $Mn^{2+}$  in processing reactions of yeast nuclear RNase P (1 RNA plus 9 protein subunits; [16]). In contrast, only a minor effect (no aberrant cleavage, only a ~5-fold reduction in the rate constant of single turnover cleavage) was observed in case of an *Rp*-phosphorothioate at the canonical cleavage site (nt -1/+1) in reactions catalyzed by

the PRORP1 isoenzyme from *Arabidopsis thaliana* (AtPRORP1), thus arguing against a role of the (pro-)Rp-oxygen in catalysis by protein-only RNase P enzymes [10]. As PRORP enzymes are distantly related to RNase H enzymes and based on the crystal structure of AtPRORP1 [11], a mechanism involving direct coordination of two metal ions to the (pro-)Sp-oxygen has been favored [10,11], although experimental evidence in support of this model has not yet been provided. Despite the inverse utilization of non-bridging oxygens at the scissile phosphodiester, RNA-based bacterial and eukaryotic protein-only RNase P enzymes have in common that they employ a two-metal-ion mechanism with a deprotonated metal ion-bound water molecule acting as the nucleophile [12].

Here, we studied the kinetics and cleavage-site selection in reactions catalyzed by AtPRORP3 in response to specific modifications at the canonical cleavage site, including Rp- and Sp-phosphorothioates as well as 2'-deoxy, 2'-fluoro, 2'-amino and 2'-O-methyl substituents in the sugar moiety of nucleotide -1. The 2'-modifications were chosen to interrogate H-bonding acceptor and donor functions, electron withdrawing properties, sugar pucker, potential protonation effects and steric constraints of the 2'-substituent at the scissile phosphodiester. We chose recombinant AtPRORP3 instead of AtPRORP1 was used because preparations of the former were consistently superior in terms of specific activity, purity, yield and apparent homogeneity [13].

## Results

### *Cleavage-site mapping for AtPRORP3 acting on pre-tRNA<sup>Gly</sup> with single-site modifications at the canonical cleavage site*

AtPRORP3 was tested for processing of precursor tRNA<sup>Gly</sup> (pre-tRNA<sup>Gly</sup>) variants with specific modifications at the canonical cleavage site (nt -1/+1, c<sub>0</sub> site; Fig. 1). Modified substrates were generated by splint ligation as described [14]. Briefly, chemically synthesized 13-mers (carrying the modification) and an 11-meric RNA oligonucleotide were annealed to a bridging DNA oligonucleotide (complementary to nt -7 to nt +35 of the pre-tRNA; Fig. 1) and ligated using T4 DNA ligase or T4 RNA ligase 2. The ligation product was then ligated to the 3'-half (transcribed by T7 RNA polymerase) of the pre-tRNA as illustrated in Fig. 1 (see Materials and methods for

details). The modified substrates were termed pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-OH] (representing the unmodified substrate), pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Rp], pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp], pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-H], pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-F], pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>] and pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-OCH<sub>3</sub>] to indicate the respective modification. Despite the possibility to obtain exclusively Rp- and Sp-phosphorothioate linkages during solid phase oligonucleotide synthesis [17], we used the traditional method of HPLC separation of diastereomers [18], as special modified phosphoramidites used in the former approach are not commercially available, and for oligonucleotides with a single phosphorothioate HPLC provides excellent resolution of diastereomers.

For cleavage site mapping, we used pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-OH] whose cleavage at the canonical site by AtPRORP enzymes was previously documented [10,13], as well as a 5'-[<sup>32</sup>P]-labeled 6-mer (5'-CCCUUU-3'; [19]) as marker for miscleavage at the m<sub>-1</sub> site. Cleavage site analysis revealed that pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-F] and pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Rp] are predominantly cleaved at the canonical c<sub>0</sub> site, whereas all other substrates showed preferential miscleavage at the m<sub>-1</sub> site (pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp], pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-H], pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>] and pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-OCH<sub>3</sub>]; Fig. 2). The formal possibility that enzyme preparations might contain traces of *E. coli* RNase P including its catalytic RNA subunit which might have influenced the results was ruled out previously [10,13].

### Single turnover kinetics

An example of our single-turnover kinetic experiments is illustrated in Fig. S1 and the results obtained with the modified pre-tRNA variants are shown in Fig. 3 and 4. Pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-F] was cleaved with a 4-fold lower  $k_{\text{react}}$  and a ~2-fold lower catalytic efficiency ( $k_{\text{react}}/K_{\text{m(sto)}}$ ) than the unmodified reference substrate pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-OH] (Fig. 3). The performance of pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Rp] was similar (5 to 6-fold lower  $k_{\text{react}}$  and a ~4-fold lower catalytic efficiency ( $k_{\text{react}}/K_{\text{m(sto)}}$ ), which is in line with the moderate effect of the Rp-phosphorothioate modification observed for the AtPRORP1 isoenzyme [10]. For pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-H], [2'-OCH<sub>3</sub>] and [Sp] causing preferentially miscleavage, the defect was primarily on the level of  $k_{\text{react}}$  (17 to 41-fold reduction) and  $k_{\text{react}}/K_{\text{m(sto)}}$  was lowest for pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-OCH<sub>3</sub>] (Fig. 4). Pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>],

also predominantly cleaved at the aberrant unmodified  $m_{-1}$  site by AtPRORP3, was processed with surprisingly high efficiency (2.7-fold lowered  $k_{\text{react}}$ , 1.6-fold increased  $K_{\text{m(sto)}}$ ) relative to the unmodified reference pre-tRNA (Fig. 4). Variation of pH did not alter cleavage-site selection for pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>] (Fig. S2), thus providing no evidence for an effect of 2'-amino protonation state on the hydrolysis reaction.

#### *Sensitivity of AtPRORP3 to phosphorothioate modifications at the cleavage site and metal-ion rescue experiments*

Neither substantial miscleavage nor dramatically reduced kinetic parameters were observed for processing of pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Rp] by AtPRORP enzymes [10]. This tolerance to an Rp-phosphorothioate modification at the scissile phosphodiester in the presence of Mg<sup>2+</sup> as the sole metal-ion cofactor argues against the possibility that catalysis by PRORP enzymes involves an inner-sphere coordination to the (*pro*-)Rp substituent [10]. This finding is in line with the mechanistic model of catalysis by AtPRORP1 which was proposed by Howard et al. [11] based on the AtPRORP1 crystal structure. According to this model, the (*pro*-)Sp oxygen simultaneously interacts with two metal ions in the transition state during cleavage. The pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp] was used as a probe to examine metal ion coordination to the (*pro*-)Sp substituent. As we had previously observed strong inhibition of AtPRORP1 enzyme activity in the presence of 2.5 mM Cd<sup>2+</sup> [10], we first determined the Cd<sup>2+</sup> concentration at which the unmodified substrate is still cleavable. 50  $\mu$ M of Cd<sup>2+</sup> was found to be compatible with enzyme activity, but higher concentrations were inhibitory (Fig. S3 A). With the less efficiently processed pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp] substrate, the sensitivity toward Cd<sup>2+</sup> was even evident at lower concentrations (Fig. S3 B) of the transition metal ion, prompting us to perform the rescue experiment with pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp] (Fig. 5) at 9.5 mM Mg<sup>2+</sup> and 12.5  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>. Under these conditions, we observed a moderate but reproducible rescue effect for cleavage of the Sp-phosphorothioate linkage. The ratio of the fractions of product cleaved at the  $c_0$  versus  $m_{-1}$  site,  $f_{c_0}/f_{m_{-1}}$  was  $0.57 \pm 0.035$  (mean  $\pm$  SD) for cleavage at 9.5 mM Mg<sup>2+</sup>/12.5  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>, and  $0.22 \pm 0.069$  for cleavage at 10 mM Mg<sup>2+</sup> (based on three independent experiments each, two-tailed *P* value = 0.0014, *t* test). Hence, our results are consistent with an inner-sphere-coordination of one or two metal ions to

the (pro-)Sp-substituent in the transition state of *At*PRORP3-catalyzed phosphodiester cleavage.

## Discussion

The unmodified reference pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-OH], obtained by RNA ligation and carrying a 7-nt 5'-flank, was cleaved by *At*PRORP3 at 20°C and pH 7.0 with a similar maximum single-turnover rate constant ( $k_{\text{react}} = 1.1 \text{ min}^{-1}$ ) as a corresponding *in vitro* transcript with a 14-nt or 7-nt 5'-flank ( $k_{\text{react}} = 1.7 \text{ min}^{-1}$  at pH 7.1) [13]. Likewise, the pre-tRNA<sup>Gly</sup> variant with a single *Rp*-phosphorothioate modification at the canonical cleavage site was cleaved with a single turnover rate constant  $k_{\text{react}}$  only 5 to 6-fold lower than that of the unmodified substrate (Fig. 3), in line with a ~5-fold reduction in the rate constant measured for the pre-tRNA<sup>Gly</sup> transcript carrying an *Rp*-phosphorothioate at all 26 G residues including the  $c_0$  site [10]. Both types of *Rp*-modified substrates were predominantly cleaved at the canonical cleavage site (Fig. 2, [10]). In this study we analyzed, for the first time, a corresponding pre-tRNA<sup>Gly</sup> variant with a single *Sp*-phosphorothioate modification at the canonical cleavage site. Despite the high sensitivity of PRORP enzymes to inactivation by  $\text{Cd}^{2+}$  ions, we were able to demonstrate a moderate but robust rescue effect, such that the fraction of pre-tRNA<sup>Gly</sup>[*Sp*] cleaved at the canonical  $c_0$  site increased in the presence of trace amounts of  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 5). This is consistent with the enzymatic mechanism proposed for PRORP enzymes involving the coordination of two metal ions to the (pro-)Sp oxygen [11,12]. The low strength of the  $\text{Cd}^{2+}$  rescue effect may include contributions from  $\text{Cd}^{2+}$  inhibition of enzyme activity, steric constraints for the accommodation of the larger  $\text{Cd}^{2+}$  ions (relative to  $\text{Mg}^{2+}$  ions) and inefficient interaction of  $\text{Cd}^{2+}$  ions with the aspartate-side chain carboxy groups that are part of the coordination sphere of the active-site metal ions [12]. The sensitivity of *At*PRORP enzymes to inhibition by  $\text{Cd}^{2+}$  ions ([10], this study) was also noticed in reactions of various eukaryotic nuclear, RNA-based RNase P enzymes with multiple protein subunits [16], suggesting that the transition metal ion is deleterious to protein function in general.

It is instructive to compare the effects of 2'-substitutions at the ribose of nt -1 (Fig. 1) in reactions catalyzed by bacterial RNase P (RNA) versus *At*PRORP3. The



2'-F modification did not induce a shift in cleavage site in both enzyme systems ([19]; Fig. 2) and the single-turnover rate constant ( $k_{\text{react}}$ ) decrease at neutral pH with  $\text{Mg}^{2+}$  as the metal ion cofactor was 6 to 7-fold for *E. coli* RNase P (RNA) and *Bacillus subtilis* RNase P [20] and 4-fold for AtPRORP3 (Fig. 3). The similarity of the effect would be in line with the 2'-OH substituent at nt -1 being involved in an H-bonding acceptor function in both enzyme systems. A 2'-F atom would weaken such an H-bonding acceptor function. It is also possible that the 2'-fluorine exerts its defect by changing the water structure around the 2'-substituent [19]. The electron withdrawing ability of 2'-fluorine may, on the other hand, facilitate formation of the 3'-oxyanion leaving group and thereby contribute to the relatively efficient cleavage of the 2'-F substrate at the site ( $c_0$ ) of modification [19].

A 2'-deoxy modification (pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-H]) had different effects, as the cleavage site was not shifted in reactions catalyzed by bacterial RNase P (RNA), but was entirely switched to the unmodified -2/-1 phosphodiester ( $m_{-1}$  site) when using AtPRORP3 as the processing enzyme. The strength of the catalytic defect in the AtPRORP3-catalyzed reaction (41-fold reduction in  $k_{\text{react}}$ , Fig. 4) was similar to that measured with the *E. coli* RNase P holoenzyme (33-fold decrease single turnover cleavage rate) or *E. coli* RNase P RNA at saturating  $[\text{Mg}^{2+}]$  (24-fold decrease). The defect was exacerbated in reactions catalyzed by the *B. subtilis* type B RNase P (~1600-fold decrease) [20]. The complete shift of cleavage site by AtPRORP3 argues that the 2'-OH at nt -1 is particularly critical for aligning the scissile phosphodiester in the active site of the protein enzyme. In comparison, bacterial (*E. coli*) RNase P seems to form redundant interactions for docking the scissile phosphodiester to the active site, as this enzyme only cleaved pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-H] aberrantly at the  $m_{-1}$  site when the base-pairing interaction with the pre-tRNA 3'-CCA end was disrupted in addition [19].

A 2'-OCH<sub>3</sub> group at nt -1 also completely shifted cleavage by AtPRORP3 to the  $m_{-1}$  site (Fig. 2), and the same shift was seen in reactions catalyzed by *E. coli* RNase P, although in the latter case the reduction in the single turnover cleavage rate constant was ~400-fold [20] versus 41-fold for AtPRORP3 (Fig. 4). *B. subtilis* RNase P was essentially unable to cleave such a substrate at all [20]. This finding suggests that a bulky 2'-OCH<sub>3</sub> substituent at nt -1 prevents docking of the canonical phosphodiester to the active site in both enzyme systems owing to steric interference

and possibly disruption of local water shell due to increased hydrophobicity. However, it seems that *At*PRORP3 is more efficient than the bacterial RNase P enzymes in utilizing the neighboring unmodified  $m_{-1}$  site despite the presence of a 2'-OCH<sub>3</sub> group at nt -1.

*At*PRORP3 cleaved pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>] mainly (~ 80%) but not exclusively at the aberrant -2/-1 site (Fig. 2) and this pattern did not change upon varying the pH between 6 and 8 (Fig. S2). In contrast, *E. coli* RNase P RNA cleaved this substrate at the canonical -1/+1 site at pH 7 to 8, but began to miscleave at the  $m_{-1}$  site at pH 6 and predominately miscleaved at pH 5 [19]. The latter finding was taken as evidence for repulsion of a catalytically important metal ion bound in the vicinity upon protonation of the 2'-amino group [19]. Such an effect can thus be excluded for E-S complexes of *At*PRORP3. The alteration of cleavage site selection caused by the 2'-amino group at nt -1 in processing by *At*PRORP3 can be taken again as evidence that an H bonding acceptor function of the 2'-OH at nt -1 is critical in catalysis by this protein-only RNase P. The prevalence of 2'-amino sugars for adopting the C2'-*endo* sugar pucker, more than any other 2'-substituent tested here [21], may have contributed as well to the miscleavage phenotype observed here.

It is evident that several cleavage-site modifications tested here, including the Sp-phosphorothioate modification, had weaker inhibitory effects on overall cleavage (sum of cleavage at the  $c_0$  and  $m_{-1}$  sites) by *At*PRORP3 than in reactions catalyzed by bacterial RNase P (RNA). For example, the pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Rp] and [Sp] substrates were cleaved in the presence of close to saturating Mg<sup>2+</sup> concentrations with single turnover rate constants reduced by three to four orders of magnitude (relative to unmodified pre-tRNA) in reactions catalyzed by *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* RNase P RNA [14,15]. With *At*PRORP3, the overall single turnover rate constants were reduced only 17-fold (Fig. 4) for the pre-tRNA<sup>Gly</sup> [Sp] and 5 to 6-fold for the Rp-modified counterpart (Fig. 3). Another example is the 2'-OCH<sub>3</sub> modification which caused more severe kinetic defects in reactions catalyzed by bacterial RNase P (see above; [20]). A possible explanation could be that *At*PRORP3, and other PRORP enzymes by inference, may be able to utilize pathways for cleavage at the  $c_0$  and  $m_{-1}$  site with similar efficiency, and utilization of the two cleavage pathways seems to be less interdependent than in the bacterial RNA-based system. Thus, modifications at the canonical phosphodiester affect cleavage at the upstream unmodified

phosphodiester much less in PRORP-catalyzed reactions. This is consistent with our finding that the 2'-amino modification shifted cleavage to > 50% to the m<sub>-1</sub> site but reduced  $k_{\text{react}}$  only 2.7-fold, while the single turnover rate constant for cleavage of pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>] by *E. coli* RNase P RNA at pH 7 and saturating [Mg<sup>2+</sup>] was at least 10-fold lower than that for the unmodified reference substrate [19]. In summary, bacterial RNase P (the *B. subtilis* enzyme more than *E. coli* RNase P) seem to select the canonical cleavage site with higher fidelity than PRORP enzymes. A substrate-dependent relaxed cleavage fidelity of PRORP enzymes observed by Howard et al. [22] would be consistent with this hypothesis. Our findings are also consistent with the results of a study on substrate recognition by AtPRORP3 using an enlarged set of truncated and mutated pre-tRNA<sup>Gly</sup> variants [13]. It was concluded that PRORP3, in contrast to bacterial RNase P, requires little to no determinants at the cleavage site, nor interactions with the extensions of the tRNA (5' leader, 3' trailer or CCA), but primarily recognizes the shape of the acceptor-T domain elements.

## Materials and methods

### *Expression and purification of recombinant A. thaliana PRORP3*

The expression and purification of recombinant AtPRORP3 was described previously [13].

### *In vitro transcription and 5'-end-labeling of RNAs*

The fragment of pre-tRNA<sup>Gly</sup> starting at nucleotide +18 (3'-portion) was obtained by run-off *in vitro* transcription using T7 RNA polymerase as described, and 5'-[<sup>32</sup>P]-end labeling of pre-tRNA substrates and ligation oligonucleotides was performed with T4 polynucleotide kinase (Thermo Scientific) as described previously [19,23,24].

### *Assembly of pre-tRNA<sup>Gly</sup>*

Oligonucleotides were phosphorylated at their 5'-termini by T4 polynucleotide kinase (Thermo Scientific). Unmodified (5'-CCC UUUCGCGGA-3') and singly 2'-modified

13-mers (5'-CCC UUUC<sub>2'</sub>-X GCGGGA-3') were from IDT or Purimex, except for the 2'-NH<sub>2</sub> variant which was a singly modified 24-mer. *Rp*- and *Sp*-diastereomeric 13-mers (5'-CCC UUUC<sub>S</sub> GCGGGA-3') were prepared by solid-phase synthesis on an Applied Biosystems 3400 Synthesizer according to the manufacturer's recommendations. The phosphorothioate group was generated by 3-((N,N-dimethylaminomethylidene)amino)-3H-1,2,4-dithiazole-5-thione (DDTT) oxidation. Oligonucleotides were purified by denaturing PAGE and diastereomers were separated by reversed-phase HPLC, using a 4.6 x 250 mm BEH OST column (130 Å, 5 µm, Waters); buffer A: 0.05 M ammonium acetate; buffer B: 0.03 M ammonium acetate, 80% acetonitrile; B 0→14% in 40 min, 1 ml/min. Diastereomer separation was less efficient when using triethylammonium acetate buffers. A second 11-nt RNA oligonucleotide (5'-GUAGCUCAGUC-3', IDT or Purimex) was annealed to a bridging DNA oligonucleotide (complementary to nucleotides -7 to +35 of pre-tRNA<sup>Gly</sup>, Fig. 1) for the first ligation step. The 3'-portion of the tRNA (obtained by T7 transcription, starting at nucleotide +18) was 5'-phosphorylated [24] and then added to the ligation mixture, followed by a second round of annealing and ligation. The ligation procedure was initially performed exactly as described previously [14]. Alternatively, the following faster procedure was used: equimolar amounts (30-60 pmol) of each oligonucleotide (13-nt RNA, 11-nt RNA and DNA-splint, including trace amounts of 5'-labeled 11-nt RNA) were incubated in ddH<sub>2</sub>O (final volume: 17 µL) in a PCR thermocycler (Biometra) for 2 min at 85°C. To anneal the components the temperature was decreased to 4°C with an increment of 5°C/min. Then 2 µL 10 x T4 RNA ligase II buffer (NEB: 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM ATP) and 1 µL T4 RNA ligase II (10 U; NEB) were added and the reaction mixture was incubated at 37°C for 1 h. Then the 3'-portion of the tRNA was added (30-60 pmol, 1-2 µL) and also annealed to the DNA splint by repeating the PCR temperature protocol described above. Subsequently, 1 µL 10 x T4 RNA ligase II buffer and 1 µL T4 RNA ligase II (10 U) were added and the volume was adjusted to 30 µL with ddH<sub>2</sub>O, followed by another incubation at 37°C for 1 h. In the case of the 2'-NH<sub>2</sub>-modified 24-mer (5'-CCC UUUC<sub>2'</sub>-NH<sub>2</sub> GCGGGAGUAGCUCAGUC-3'), the first ligation step was omitted. Assembled ptRNAs were subjected to DNase I digestion (RNase free, Thermo Scientific, 1 h at 37°C and 5 min at 75°C) and purified by denaturing 10% PAGE (8 M urea) essentially as described previously [14].

### Processing assays

Single-turnover experiments with *A. thaliana* PRORP3 were performed in buffer F (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 20 µg/mL BSA, pH 7.0) supplemented with divalent cations: either Mg(OAc)<sub>2</sub> (4.5 or 10 mM) or Mg(OAc)<sub>2</sub> (9.5 mM) and Cd(OAc)<sub>2</sub> (12.5 µM) as indicated. The divalent cations were added to the reaction buffer immediately before preincubation of substrate and enzyme solutions. Cd(OAc)<sub>2</sub> was freshly dissolved before usage to prevent formation of insoluble hydroxides. The enzyme was preincubated for 5 min at 20°C. The substrate was preincubated for 5 min at 55°C, for 20 min at 37°C and for 10 min at 20°C. The reaction (at 20°C) was started by combining substrate (usually 6 µL) and enzyme solutions (usually 18 µL; final concentrations: 5 nM, 25 nM, 100 nM, 300 nM *At*PRORP3). Aliquots (4 µL) were withdrawn at different time points, and reactions were stopped by adding 6 µL of ice-cold stop solution (2 x TBE buffer, 2.6 M urea, 66 % [v/v] formamide, bromophenol blue and xylene cyanol blue, each 0.02% [w/v]). RNAs were separated by denaturing 20% or 25% PAGE (8 M urea). The 5'-<sup>32</sup>P-labeled pre-tRNA substrate and the 5'-cleavage product were quantified with a Bio-Imaging Analyzer FLA3000–2R (Fujifilm) and the analysis software AIDA (Raytest). First-order rate constants of cleavage ( $k_{\text{obs}}$ ) were calculated by nonlinear regression analysis (Grafit 5.0.13) fitting the data to the equation:  $f_{\text{cleaved}} = f_{\text{endpoint}} (1 - e^{-(k_{\text{obs}})t})$ , where  $f_{\text{cleaved}}$  = fraction of pre-tRNA cleaved,  $t$  = time,  $f_{\text{endpoint}}$  = maximum cleavable fraction of pre-tRNA.  $K_{\text{m(sto)}}$  and  $k_{\text{react}}$  were obtained by fitting the data to the equation:  $k_{\text{obs}} = k_{\text{react}} \times [\text{PRORP3}] / (K_{\text{m(sto)}} + [\text{PRORP3}])$ ;  $k_{\text{react}}$  is the maximal single turnover rate [23].

### References

1. Hartmann, R. K., Gössringer, M., Späth, B., Fischer, S. & Marchfelder, A. (2009). The making of tRNAs and more – RNase P and tRNase Z. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85, 319-368.
2. Klemm, B. P., Wun, N., Chen, Y., Liu, X. Kaitany, K. J., Howard, M. J. & Fierke, C. A. (2016). The Diversity of Ribonuclease P: Protein and RNA Catalysts with Analogous Biological Functions. *Biomolecules* 13, 6.
3. Hartmann, E. & Hartmann, R. K. (2003). The enigma of ribonuclease P evolution. *Trends Genet.* 19, 561-569.
4. Evans, D., Marquez, S. M. & Pace, N. R. (2006). RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* 31, 333-341.

5. Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K. L., Gerner, C. & Rossmanith, W. (2008). RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135, 462-474.
6. Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Gössringer, M., Holzmann, J., Hartmann, R. K., Rossmanith, W. & Giegé, P. (2010). A single *Arabidopsis* organellar protein has RNase P activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 740-744.
7. Gutmann, B., Gobert, A. & Giegé, P. (2012). PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 26, 1022-1027.
8. Taschner, A., Weber, C., Buzet, A., Hartmann, R. K., Hartig, A. & Rossmanith, W. (2012). Nuclear RNase P of *Trypanosoma brucei*: a single protein in place of the multicomponent RNA-protein complex. *Cell Rep.* 2, 19-25.
9. Lechner, M., Rossmanith, W., Hartmann, R. K., Thölken, C., Gutmann, B., Giegé, P. & Gobert, A. (2015). Distribution of Ribonucleoprotein and Protein-Only RNase P in Eukarya. *Mol. Biol. Evol.* 32, 3186-3193.
10. Pavolova, L. V., Gössringer, M., Weber, C., Buzet, A., Rossmanith, W. & Hartmann, R. K. (2012). tRNA processing by protein-only versus RNA-based RNase P: kinetic analysis reveals mechanistic differences. *Chembiochem.* 13, 2270-2276.
11. Howard, M. J., Lim, W. H., Fierke, C. A. & Koutmos, M. (2012). Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16149-16154.
12. Howard, M. J., Klemm, B. P. & Fierke, A. (2015). Mechanistic Studies Reveal Similar Catalytic Strategies for Phosphodiester Bond Hydrolysis by Protein-only and RNA-dependent Ribonuclease P. *J. Biol. Chem.* 290, 13454-13464.
13. Brillante, N., Gössringer, M., Lindenhofer, D., Toth, U., Rossmanith, W. & Hartmann, R. K. (2016). Substrate recognition and cleavage-site selection by a single-subunit protein-only RNase P. *Nucleic Acids Res.* 44, 2323-2336.
14. Warnecke, J. M., Fürste, J. P., Hardt, W. D., Erdmann, V. A. & Hartmann, R. K. (1996). Ribonuclease P (RNase P) RNA is converted to a Cd(2+)-ribozyme by a single Rp-phosphorothioate modification in the precursor tRNA at the RNase P cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8924-8928.
15. Warnecke, J. M., Held, R., Busch, S. & Hartmann, R. K. (1999). Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 290, 433-445.
16. Pfeiffer, T., Tekos, A., Warnecke, J. M., Drinas, D., Engelke, D. R., Séraphin, B. & Hartmann, R. K. (2000). Effects of phosphorothioate modifications on precursor tRNA processing by eukaryotic RNase P enzymes. *J. Mol. Biol.* 298, 559-565.
17. Oka, N., Wada, T. & Saigo, K. (2003). An oxazaphospholidine approach for the stereocontrolled synthesis of oligonucleoside phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8307-8317.
18. Frederiksen, J. K. & Piccirilli, J. A. (2009). Separation of RNA phosphorothioate oligonucleotides by HPLC. *Methods Enzymol.* 468, 289-309.
19. Persson, T., Cuzic, S. & Hartmann, R. K. (2003). Catalysis by RNase P RNA: unique features and unprecedented active site plasticity. *J. Biol. Chem.* 278, 43394-43401.
20. Cuzic-Feltens, S., Weber, M. H. W. & Hartmann, R. K. (2009). Investigation of catalysis by bacterial RNase P via LNA and other modifications at the scissile phosphodiester. *Nucleic Acids Res.* 37, 7638-7653.
21. Guschlbauer, W. & Jankowski, K. (1980). Nucleoside conformation is determined by the electronegativity of the sugar substituent. *Nucleic Acids Res.* 8, 1421-1433.
22. Howard, M. J., Karasik, A., Klemm, B. P., Mei, C., Shanmuganathan, A., Fierke, C. A. & Koutmos, M. (2016). Differential substrate recognition by isozymes of plant protein-only Ribonuclease P. *RNA* 22, 782-792.

23. Busch, S., Kirsebom, L. A., Notbohm, H. & Hartmann, R. K. (2000) Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA. J. Mol. Biol. 299, 941-951.
24. Cuzic, S. & Hartmann, R. K. (2007). A 2'-methyl or 2'-methylene group at G+1 in precursor tRNA interferes with Mg<sup>2+</sup> binding at the enzyme-substrate interface in E-S complexes of *E. coli* RNase P. Biol. Chem. 388, 717-726.

## Acknowledgements

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, HA 1672/17-1 and IRTG 1384) to R.K.H., Russian Science Foundation (RSF, project N 14-24-00061, synthesis of oligonucleotides with single phosphorothioate group) to T.S.Z. and T.S.O., and the Austrian Science Fund (FWF) [I299] to W.R. We thank Sören Seidler for excellent support with kinetic experiments and F. Eckstein for the generous gift of modified oligonucleotides. We would also like to thank D. Helmecke, Aurélie Buzet and Y. Asfaha for excellent technical assistance.

## Figure Legends

**Fig. 1:** The bacterial pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate with single-site modifications at the canonical RNase P cleavage site ( $c_0$ , -1/+1). The filled arrow depicts the canonical cleavage site ( $c_0$ ), the open arrow the aberrant cleavage site  $m_{-1}$  between nucleotides -2 and -1. The introduced modifications are illustrated in the boxes on the left. The sites for splint ligation of RNA fragments are marked by gray-shaded boxes in the secondary structure on the right.

**Fig. 2:** Cleavage-site selection by AtPRORP3 in pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate variants with the indicated modifications at the -1/+1 phosphodiester ( $c_0$  site). Trace amounts of substrate were incubated with 100 nM AtPRORP3 in buffer F supplemented with 4.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> at 20°C for 1 h. Reactions were analyzed by 25% denaturing PAGE. For discrimination of  $c_0$  and  $m_{-1}$  cleavage, a synthetic RNA 6-mer (5'-CCCUUU-3') was used, corresponding to cleavage at position -2/-1 ( $m_{-1}$  site). In the gel image on the left showing the cleavage product for the 2'-F-modified substrate, the corresponding products for the unmodified (2'-OH), 2'-OCH<sub>3</sub>- and 2'-H-modified substrates are included as references.

**Fig. 3:** Single-turnover kinetics for *At*PRORP3 with modified substrates that are cleaved predominantly at the canonical cleavage site. Processing assays were performed at 20°C in buffer F (pH 7, 4.5 mM Mg<sup>2+</sup>). Timepoints in the graphs on the left are mean values derived from three independent experiments; error bars are standard errors of the mean (SEM). The kinetic parameters are based on overall cleavage (sum of  $c_0$  and  $m_{-1}$  cleavage). The primary data (left side) were used to fit the pseudo first order rate constant  $k_{\text{obs}}$ . The rate constants for different concentrations of *At*PRORP3 were used to determine the kinetic parameters  $K_{\text{m(sto)}}$  and  $k_{\text{react}}$  ( $\pm$  standard deviation) based on the graphs shown on the right (error bars: SEM), and the specificity constant ( $k_{\text{react}}$  divided by  $K_{\text{m(sto)}}$ ).

**Fig. 4:** Single-turnover kinetics for *At*PRORP3 with modified substrates that are predominantly miscleaved at the  $m_{-1}$  site. Processing assays were performed at 20°C in F buffer (pH 7, 4.5 mM Mg<sup>2+</sup>). Primary graphs on the left represent means ( $\pm$  SEM) derived from three independent experiments. The kinetic parameters are based on overall cleavage (sum of  $c_0$  and  $m_{-1}$  cleavage). For the fitting of  $K_{\text{m(sto)}}$  and  $k_{\text{react}}$  in the graphs for pre-tRNA<sup>Gly</sup> [2'-H], [2'-OCH<sub>3</sub>] and [Sp] on the right, the data points obtained at 5 nM *At*PRORP3 are shown but were only used for the curve fitting in the case of the 2'-NH<sub>2</sub> substrate, as they impaired the quality of the fits in case of the other substrates. For further details, see legend to Fig. 3.

**Fig. 5:** Rescue experiments with pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp]. Trace amounts of unmodified pre-tRNA<sup>Gly</sup> (lanes 1 and 3) or pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp] carrying a phosphorothioate diester at the canonical  $c_0$  site (lanes 4 and 5) were incubated with *At*PRORP3 in buffer F supplemented either with 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> (indicated by \*) or with 9.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> plus 12.5  $\mu$ M Cd(OAc)<sub>2</sub> (indicated by \*\*). Lane 2: as lane 1, but omitting *At*PRORP3. For pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp], the addition of thiophilic Cd<sup>2+</sup> resulted in a moderate (twofold) but reproducible increase in the fraction of the canonical cleavage product (see text), suggesting a rescue effect. The fraction of product cleaved at the canonical site was calculated based on the boxed signal intensities (lanes 4 and 5) as  $I_{c_0} / (I_{c_0} + I_{m_{-1}})$ ;  $I$  = intensity.



Figures

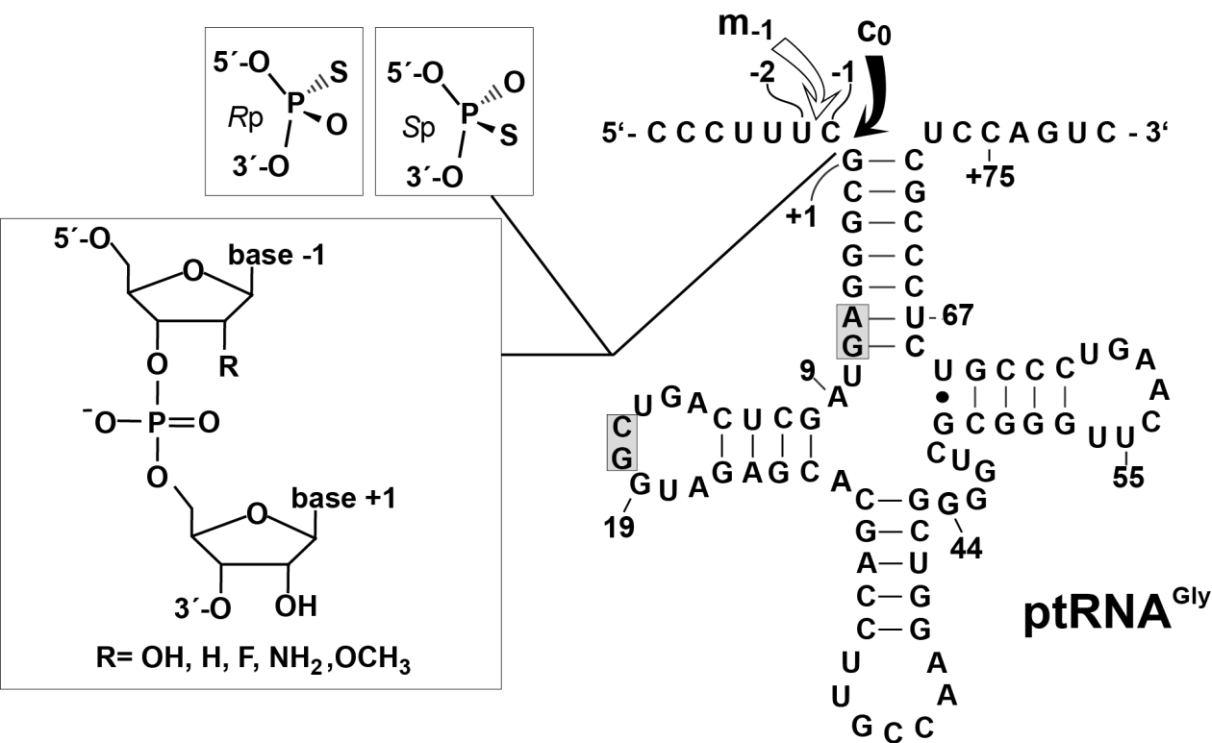
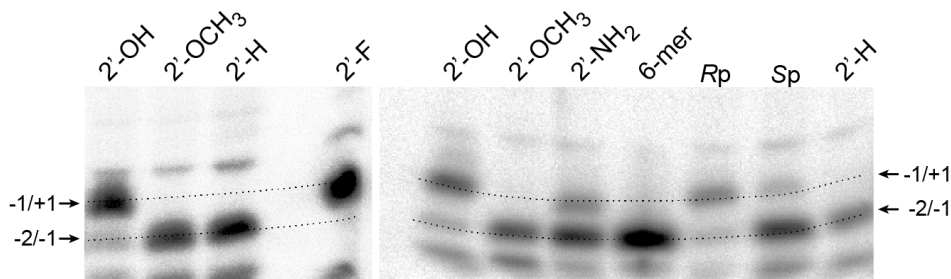


Fig. 1



substrate	predominant cleavage site
2'-OH	-1/+1 (c <sub>0</sub> )
2'-F	-1/+1 (c <sub>0</sub> )
2'-OCH <sub>3</sub>	-2/-1 (m <sub>-1</sub> )
2'-NH <sub>2</sub>	-2/-1 (m <sub>-1</sub> )
2'-H	-2/-1 (m <sub>-1</sub> )
Rp	-1/+1 (c <sub>0</sub> )
Sp	-2/-1 (m <sub>-1</sub> )

Fig. 2

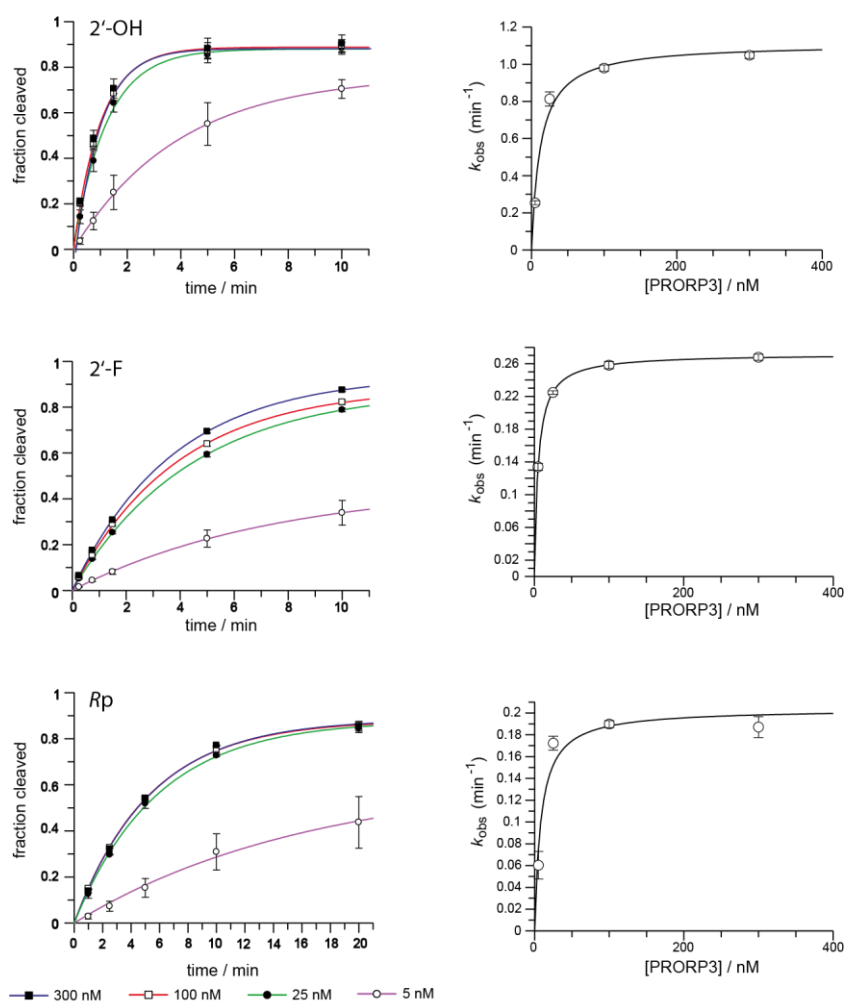


Fig. 3

substrate	$k_{\text{react}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{m(sto)}}$ (nM)	$k_{\text{react}}/K_{\text{m(sto)}}$ ( $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
2'-OH	$1.11 \pm 0.0064$	$12.33 \pm 3.37$	90.02
2'-F	$0.27 \pm 0.0005$	$5.17 \pm 0.54$	52.22
Rp	$0.20 \pm 0.016$	$8.42 \pm 3.50$	23.75

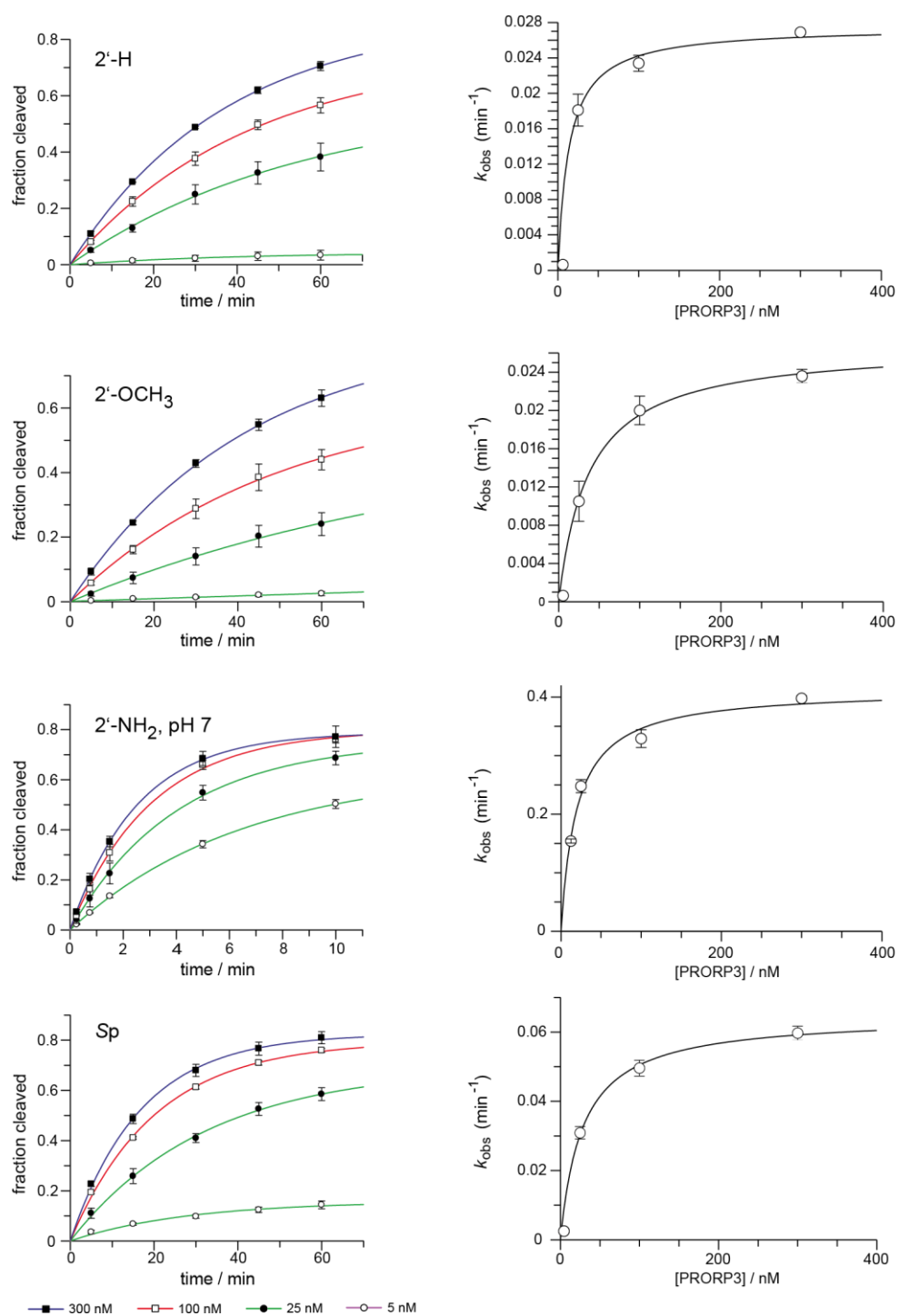


Fig. 4

substrate	$k_{\text{react}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{m(sto)}}$ (nM)	$k_{\text{react}}/K_{\text{m(sto)}}$ ( $10^6 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
2'-H	$0.027 \pm 0.0011$	$13.61 \pm 3.1$	1.98
2'-OCH <sub>3</sub>	$0.027 \pm 0.0009$	$37.21 \pm 4.4$	0.73
2'-NH <sub>2</sub>	$0.41 \pm 0.02$	$19.37 \pm 3.47$	21.17
Sp	$0.065 \pm 0.0015$	$28.13 \pm 2.65$	2.31

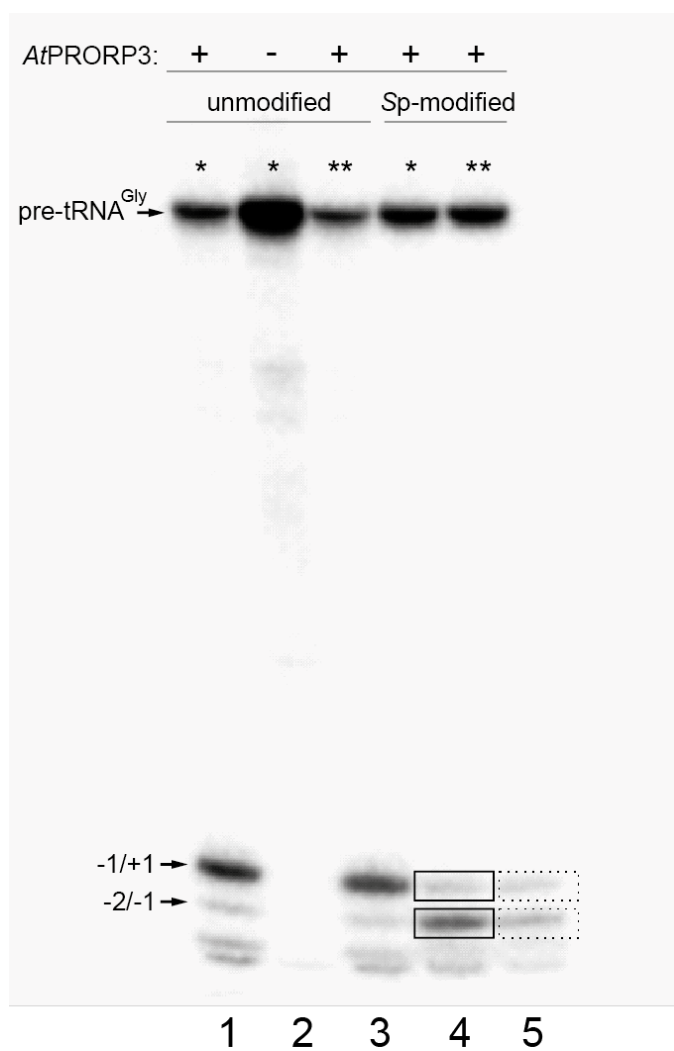


Fig. 5

## **Supplementary Material**

### **Analysis of the cleavage mechanism by protein-only RNase P using precursor tRNA substrates with modifications at the cleavage site**

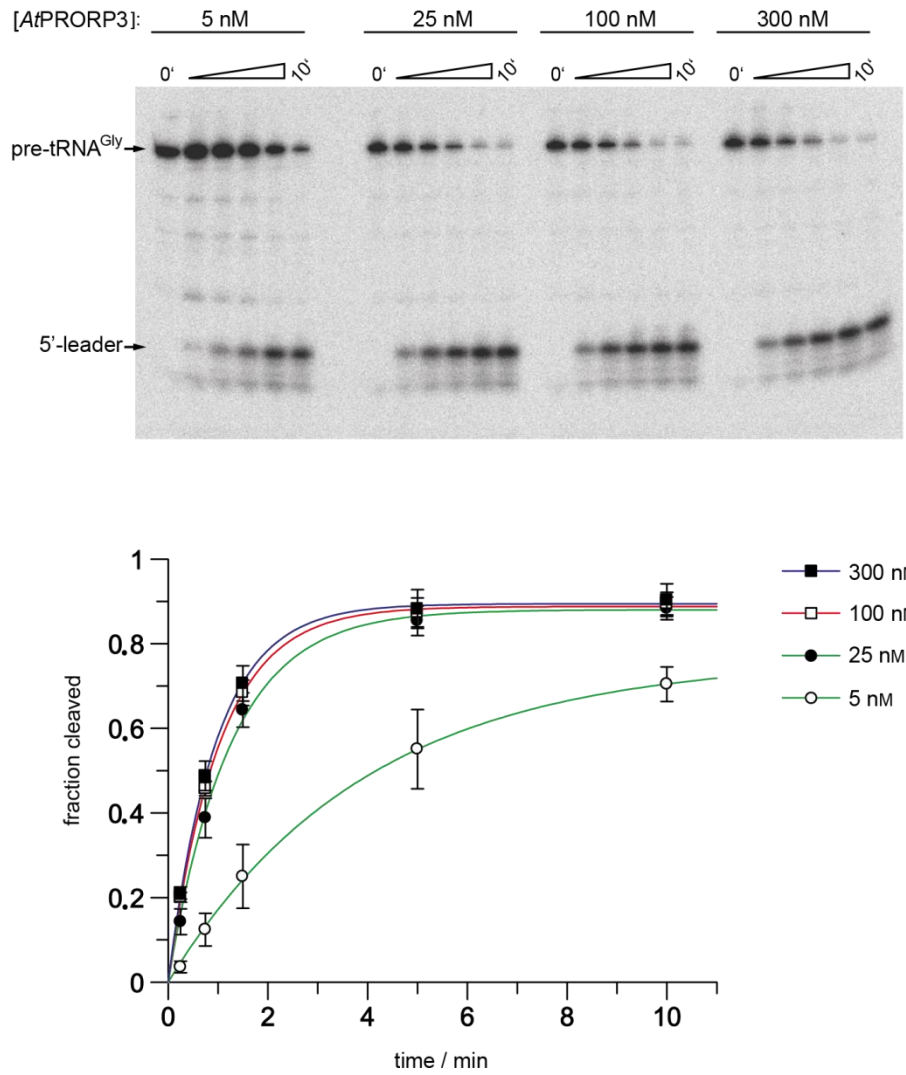
Dennis Walczyk<sup>1</sup>, Markus Gößringer<sup>1</sup>, Walter Rossmanith<sup>2</sup>, Timofei S. Zatsepin<sup>3,4</sup>,  
Tatiana S. Oretskaya<sup>3</sup>, Roland K. Hartmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pharmaceutical Chemistry, Philipps-University Marburg, 35037 Marburg, Germany

<sup>2</sup> Center for Anatomy & Cell Biology, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

<sup>3</sup> Chemistry Department and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, 3 Nobel street, Innovation Center “Skolkovo”, 143026 Skolkovo, Russia



**Fig. S1:** Illustration of single-turnover kinetics performed at different *AtPRORP3* concentrations. Processing assays were performed at 20°C and pH 7 with trace amounts of unmodified pre-tRNA<sup>Gly</sup> in buffer F containing 4.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>. An example of a 20% denaturing PAA gel is shown at the top. Timepoints between 0 and 10 min were 15 s, 45 s, 90 s and 5 min. Derived time courses of cleavage presented in the graph at the bottom are based on the mean derived from three independent experiments; error bars are standard errors of the mean (SEM).

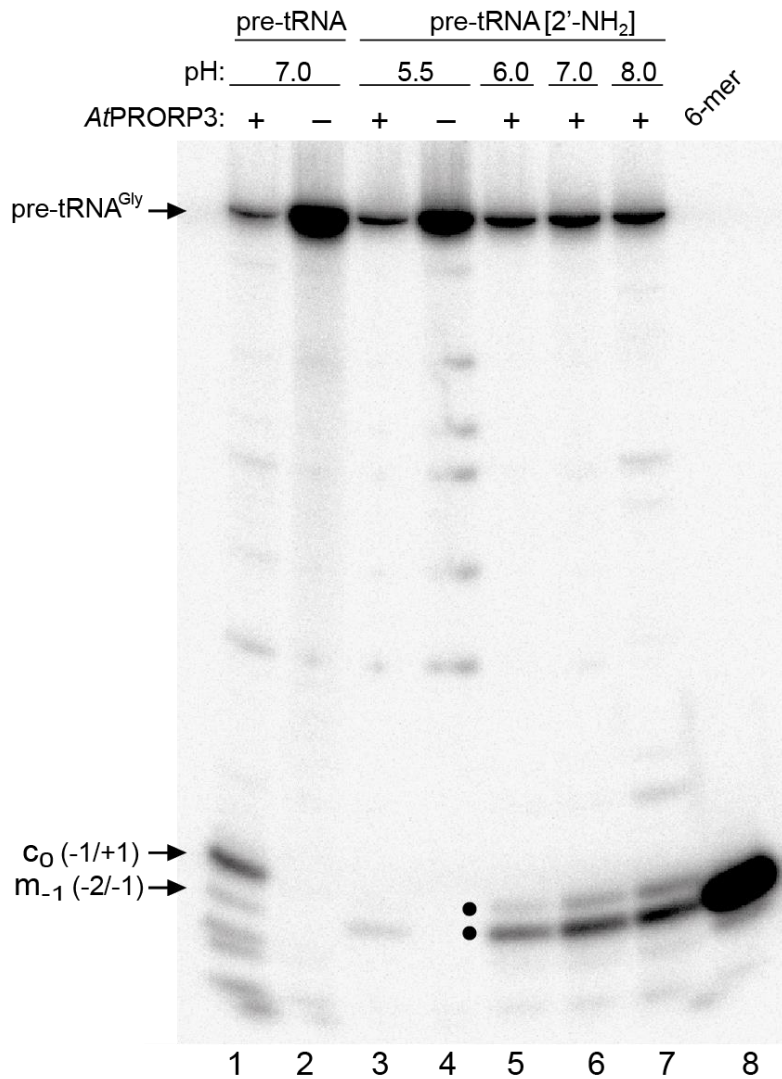
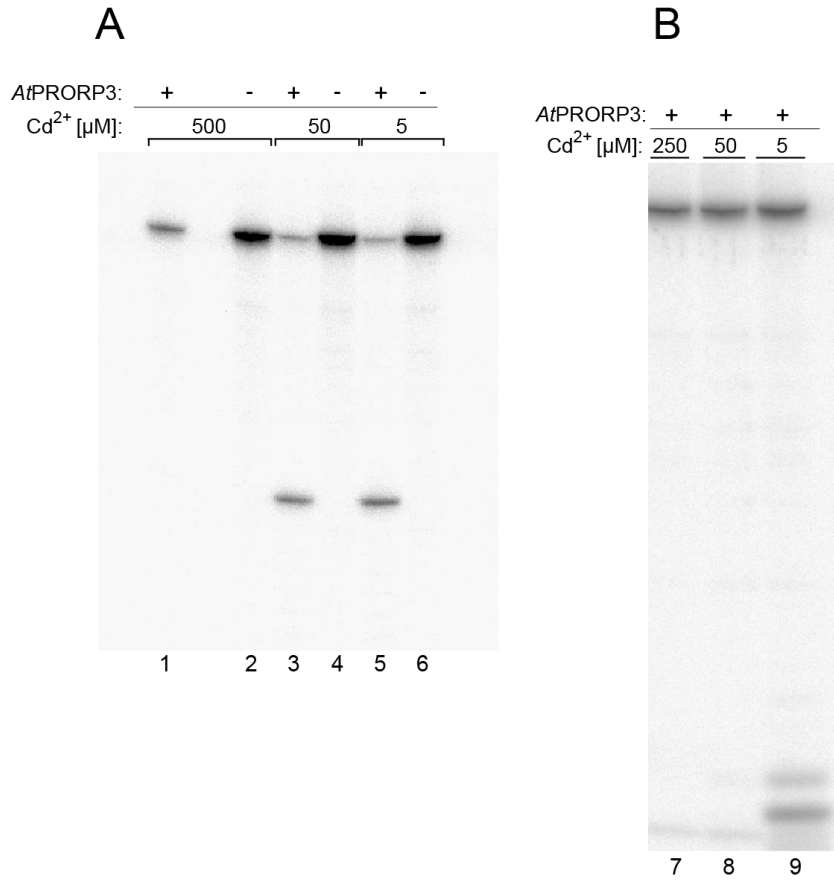


Fig. **S2**: pH-dependency of pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>] cleavage by AtPRORP3. Trace amounts of unmodified (lanes 1, 2) or 2'-NH<sub>2</sub>-modified pre-tRNA<sup>Gly</sup> (lanes 3-7) were incubated with 225 nM AtPRORP3 in buffer F under different pH conditions. The pH (and, by inference, the protonation state of the 2'-NH<sub>2</sub>-group of the substrate) had no influence on site selection of pre-tRNA<sup>Gly</sup>[2'-NH<sub>2</sub>] cleavage by AtPRORP3.



**Fig. S3:** Cd<sup>2+</sup> inhibition of AtPRORP3 activity. **(A)** Trace amounts of unmodified pre-tRNA<sup>Gly</sup> were incubated with 225 nM AtPRORP3 for 10 min in buffer F supplemented with 9.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> plus 500 μM (lanes 1 and 2), 50 μM (lanes 3 and 4), 5 μM (lanes 5 and 6) Cd(OAc)<sub>2</sub>. **(B)** As in panel A, but using pre-tRNA<sup>Gly</sup>[Sp] as substrate and 9.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> plus 250 μM (lane 7), 50 μM (lane 8) or 5 μM (lane 9) Cd(OAc)<sub>2</sub>. Incubation times were 10 min (A) and 20 min (B) at 20°C. The shown experiments provided the basis for choosing 9.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> and 12.5 μM Cd(OAc)<sub>2</sub> for the rescue experiments in Fig. 5 of the main manuscript.



## 4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten sowohl auf dem Gebiet der Inhibition der bakteriellen RNase P als auch im Bereich der mechanistischen Untersuchung des Enzyms PRORP Fortschritte erzielt werden. Auf dieser Basis ergeben sich spezifische Ansätze für weiterführende Arbeiten.

### 4.1 Beiträge zur Inhibition der bakteriellen RNase P

Durch die Verwendung von *Antisense*-Oligonukleotiden konnte eine sehr effiziente Inhibition der bakteriellen RNase P aus *B. subtilis* erreicht werden (3.1.1 *Antisense*-Oligonukleotide). Die hier vorgestellten LNA-modifizierten Oligonukleotide können ohne weiteres im Rahmen biochemischer Assays mit Bakterienextrakten verwendet werden. So könnte für Prozessierungs-Studien in Zellextrakten zunächst die endogene RNase P durch Inkubation mit den LNA-Oligonukleotiden gehemmt werden, um anschließend die Prozessierung langlebiger Vorläufer-RNAs mit exogen zugeführter RNase P fortzuführen und so den Nachweis einer spezifischen Prozessierung durch RNase P zu erbringen. Um die LNA-Oligonukleotide für *in vivo* Applikationen einsetzen zu können, müsste zuerst eine entsprechende *Delivery*-Strategie entwickelt werden. Hier könnten beispielsweise sequenzidentische PNAs verwendet werden, die an ein invasives Peptid gekoppelt sind. In einem ähnlichen Projekt, in dem die RNase P von *E. coli* adressiert wurde, konnte mit dieser Strategie eine effiziente *in vivo* Inhibition erreicht werden.<sup>34</sup> Als Alternative könnte man versuchen, die *Antisense*-Moleküle in Nanopartikel zu verpacken und diese als Transporter zu verwenden.<sup>69</sup> Die in eukaryontischen Systemen erfolgreich verwendete Nanopartikel-Technologie dürfte allerdings bei extrazellulär existierenden Bakterien aufgrund der zusätzlichen Zellwand-Barriere wenig erfolgversprechend sein. Nanopartikel könnten allerdings bei intrazellulären bakteriellen Pathogenen wie Mycoplasmen, deren Zellhülle durchlässiger ist, eine gewisse Aussicht auf Erfolg haben.

Die Untersuchung neuer Guanidinium-derivatisierter Aminoglykoside zeigte zwar eine deutliche Inhibition, allerdings stellte sich heraus, dass die Ursache eher eine unspezifische Bindung sowohl an tRNA als auch an P RNA war (3.1.2 Aminoglykoside). Daher erscheint eine weitere Untersuchung dieser Verbindungen kaum sinnvoll. Als sehr starker tRNA-Binder

ist allerdings das Aminoglykosid 5-epi-Sisomycin bekannt. Die Epimerisierung von Sisomycin zu 5-epi-Sisomycin ist mit einer Zunahme der Affinität um mehrere Größenordnungen verknüpft. Zur Klärung der molekularen Ursache(n) wäre eine entsprechende vergleichende Strukturaufklärung von RNA-Komplexen mit Sisomycin versus 5-epi-Sisomycin interessant, um besser evaluieren zu können, ob eine Epimerisierung mit dem Ziel einer Affinitätserhöhung auch für andere Aminoglykoside vielversprechend sein könnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Heterozyklen, die an die zentrale Furche des P Proteins binden sollten, zeigten letztlich keinen signifikanten inhibitorischen Effekt (3.1.3 Heterozyklen). Nichtsdestotrotz ist das P Protein *in vivo* essentiell für das bakterielle Überleben und damit ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuartiger Antibiotika. Es sollte daher ein lohnenswertes Unterfangen sein, alternative Verbindungen zu entwickeln, die hochaffin an das P Protein binden. Die bisher getesteten Verbindungen sollten möglichst in die zentrale Furche des P Proteins binden. Allerdings waren sie sehr unpolar und dadurch schlecht löslich. Diese Tatsache verursachte bei der Evaluation der Heterozyklen massive Probleme und sollte bei zukünftigen Studien in die Überlegungen einbezogen werden. Eine Alternative wäre die Entwicklung von Verbindungen mit partiell negativen Ladungen, die mit positiven Oberflächenladungen des Proteins im Bereich der Kontaktstellen mit der 5'-Flanke sowie der katalytischen RNA interagieren. Der Ansatz des Fragment-basierten *in silico* Screenings könnte dabei hilfreich sein, um zunächst kleine Bindungs-Moleküle zu identifizieren, deren Grundgerüst anschließend sukzessive chemisch erweitert werden kann, um die Affinität und Spezifität der potentiellen Inhibitoren zu verbessern.

Bei dem am FMP in Berlin durchgeführten *high throughput screening* wurden keine RNase P-spezifischen Inhibitoren für *E. coli* identifiziert. Der Ansatz erlaubte allerdings nicht die Unterscheidung, ob der Grund hierfür darin lag, dass die Bibliothek keine solchen Verbindungen enthielt, oder ob zwar prinzipiell Inhibitoren vorhanden gewesen wären, diese aber nicht in der Lage waren, die bakterielle Zellwand zu überwinden. Ein weiterführender Ansatz wäre es daher, das *Screening* mit einer Zellwand-defekten *E. coli* BW-Variante zu wiederholen. Sollte auf diese Art ein potenter Inhibitor gefunden werden, könnte in einer weiterführenden Arbeit eine effiziente *Delivery*-Strategie entwickelt werden. Alternativ wäre es auch eine Überlegung, das *Screening* mit einer größeren Substanzbibliothek zu wiederholen. Gerade im industriellen Bereich existieren Bibliotheken, die um den Faktor zehn größer sind.

## 4.2 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der RNase P aus *A. thaliana*

Durch die Ligation singulär modifizierter Prä-tRNA-Substrate konnten die Voraussetzungen geschaffen werden, um eine vergleichende Analyse zwischen der bakteriellen RNase P und der proteinbasierten RNase P aus *A. thaliana* vorzunehmen. Auf dieser Basis wurden sowohl Gemeinsamkeiten (Toleranz gegenüber bestimmter 2'-Modifikationen) als auch Unterschiede (z.B. pro-Rp- versus pro-Sp-Koordination katalytischer Metallionen) zwischen beiden enzymatischen Systemen herausgearbeitet. Allerdings konnte aufgrund der Inhibition des Enzyms PRORP durch geringe Konzentrationen des thiophilen Übergangsmetallions  $\text{Cd}^{2+}$  nur eine moderate Kurierung der Spaltung des Sp-modifizierten Substrats in Gegenwart von  $12.5 \mu\text{M Cd}^{2+}$  beobachtet werden, die jedoch mit einer Metallionen-Koordination an den pro-Sp-Sauerstoff im Übergangszustand konsistent ist. Für die abschließende Klärung der verbliebenen Fragen und Unsicherheiten wäre eine (Co-)Strukturbestimmung des Enzyms PRORP mit gebundenem Substrat sicherlich zielführend. Erste Kristallstrukturen des Enzyms PRORP sind bereits verfügbar. Daher würde sich für die Fragestellung auch die Verwendung von Wasserstoff-Deuterium-Austauschexperimenten (HDX) in Verbindung mit hochauflösender mehrdimensionaler Massenspektrometrie anbieten. Diese Methode erlaubt die Kartierung von Proteinoberflächen mit mittlerweile sehr genauer Auflösung.<sup>70</sup> Insbesondere Liganden lassen sich sehr genau zuordnen und selbst Nukleinsäuren können mit Hilfe dieser Methode als Liganden verwendet werden. Die Methode würde es also erlauben, ein als Ligand gebundenes Prä-tRNA-Molekül strukturell einzelnen Aminosäuren des Enzyms PRORP zuzuordnen und auf diese Weise die Oberflächenplastizität des Enzyms zu beschreiben. Diese Informationen könnten mit der Toleranz/Intoleranz gegenüber bestimmter Substratmodifikationen an der Spaltstelle (z.B. 2'-OCH<sub>3</sub>) korreliert werden, um so ein detailliertes Bild der Architektur des aktiven Zentrums und der Enzym-Substrat-Kontakte zu erhalten.

## 5 Literatur

1. Hartmann, R. K., Gössringer, M., Späth, B., Fischer, S. & Marchfelder, A. The making of tRNAs and more - RNase P and tRNase Z. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **85**, 319–68 (2009).
2. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849–57 (1983).
3. Evans, D., Marquez, S. M. & Pace, N. R. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 333–41 (2006).
4. Steitz, T. & Steitz, J. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 6498–6502 (1993).
5. Bartel, D. & Unrau, P. Constructing an RNA world. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 9–13 (1999).
6. Walker, S. C. & Engelke, D. R. A protein-only RNase P in human mitochondria. *Cell* **135**, 412–4 (2008).
7. Holzmann, J. *et al.* RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell* **135**, 462–474 (2008).
8. Gobert, A. *et al.* A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 740–4 (2010).
9. Walczyk, D. & Hartmann, R. K. Von der RNA-zur Protein-Welt. *q&more* **2**, 6–11 (2013).
10. Commichau, F. M., Pietack, N. & Stülke, J. Essential genes in *Bacillus subtilis*: a re-evaluation after ten years. *Mol. Biosyst.* **9**, 1068–75 (2013).
11. Wegscheid, B., Condon, C. & Hartmann, R. K. Type A and B RNase P RNAs are interchangeable in vivo despite substantial biophysical differences. *EMBO Rep.* **7**, 411–7 (2006).
12. Kazantsev, A. V & Pace, N. R. Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 729–40 (2006).
13. Tsai, H.-Y., Masquida, B., Biswas, R., Westhof, E. & Gopalan, V. Molecular Modeling of the Three-dimensional Structure of the Bacterial RNase P Holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **325**, 661–675 (2003).
14. Gopalan, V., Baxevanis, a D., Landsman, D. & Altman, S. Analysis of the functional role of conserved residues in the protein subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **267**, 818–29 (1997).

15. Kirsebom, L. a & Vioque, a. RNase P from bacteria. Substrate recognition and function of the protein subunit. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 99–109 (1996).
16. Niranjanakumari, S., Stams, T., Crary, S. M., Christianson, D. W. & Fierke, C. a. Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15212–7 (1998).
17. Sun, L., Campbell, F. E., Yandek, L. E. & Harris, M. E. Binding of C5 protein to P RNA enhances the rate constant for catalysis for P RNA processing of pre-tRNAs lacking a consensus (+ 1)/C(+ 72) pair. *J. Mol. Biol.* **395**, 1019–37 (2010).
18. Crary, S. M., Niranjanakumari, S. & Fierke, C. a. The protein component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA<sup>Asp</sup>. *Biochemistry* **37**, 9409–16 (1998).
19. Kurz, J. C., Niranjanakumari, S. & Fierke, C. A. Protein Component of *Bacillus subtilis* RNase P Specifically Enhances the Affinity. *Biochemistry* **37**, 2393–2400 (1998).
20. Koutmou, K., Day-Storms, J. & Fierke, C. The RNR motif of *B. subtilis* RNase P protein interacts with both PRNA and pre-tRNA to stabilize an active conformer. *RNA* **17**, 1225–1235 (2011).
21. Henkels, C., Kurz, J., Fierke, C. & Oas, T. Linked folding and anion binding of the *Bacillus subtilis* ribonuclease P protein. *Biochemistry* **40**, 2777–2789 (2001).
22. Guo, X. *et al.* RNA-dependent folding and stabilization of C5 protein during assembly of the *E. coli* RNase P holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **360**, 190–203 (2006).
23. Stams, T., Niranjanakumari, S., Fierke, C. A. & Christianson, D. W. Ribonuclease P protein structure: evolutionary origins in the translational apparatus. *Science* **280**, 752–755 (1998).
24. Guenther, U.-P. *et al.* Hidden specificity in an apparently nonspecific RNA-binding protein. *Nature* **502**, 385–8 (2013).
25. Howard, M. J., Lim, W. H., Fierke, C. a & Koutmos, M. Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16149–54 (2012).
26. Smith, D., Burgin, A. B., Haas, E. S. & Pace, N. R. Influence of Metal Ions on the Ribonuclease P Reaction. *J. Biol. Chem.* **267**, 2429–2436 (1992).
27. Beebe, J. & Fierke, C. A kinetic mechanism for cleavage of precursor tRNA<sup>Asp</sup> catalyzed by the RNA component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **33**, 10294–10304 (1994).
28. Brännvall, M., Kikovska, E., Wu, S. & Kirsebom, L. a. Evidence for induced fit in bacterial RNase P RNA-mediated cleavage. *J. Mol. Biol.* **372**, 1149–64 (2007).

29. Warnecke, J. M., Fürste, J. P., Hardt, W. D., Erdmann, V. a & Hartmann, R. K. Ribonuclease P (RNase P) RNA is converted to a Cd(2+)-ribozyme by a single Rp-phosphorothioate modification in the precursor tRNA at the RNase P cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8924–8 (1996).
30. Warnecke, J. M., Held, R., Busch, S. & Hartmann, R. K. Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **290**, 433–45 (1999).
31. Willkomm, D., Pfeffer, P., Reuter, K., Klebe, G. & Hartmann, R. K. in *Protein Rev.* (eds. Fenyong, L. & Altman, S.) 235–256 (Springer New York, 2010).
32. Willkomm, D. K. *et al.* Evaluation of bacterial RNase P RNA as a drug target. *Chembiochem* **4**, 1041–8 (2003).
33. Gruegelsiepe, H., Willkomm, D. K., Goudinakis, O. & Hartmann, R. K. Antisense inhibition of *Escherichia coli* RNase P RNA: mechanistic aspects. *Chembiochem* **4**, 1049–56 (2003).
34. Gruegelsiepe, H., Brandt, O. & Hartmann, R. K. Antisense inhibition of RNase P: mechanistic aspects and application to live bacteria. *J. Biol. Chem.* **281**, 30613–20 (2006).
35. Childs, J. L. Inhibition of *Escherichia coli* RNase P by oligonucleotide directed misfolding of RNA. *RNA* **9**, 1437–1445 (2003).
36. Hori, Y., Bichenkova, E. & Wilton, A. Synthetic inhibitors of the processing of pretransfer RNA by the ribonuclease P ribozyme: enzyme inhibitors which act by binding to substrate. *Biochemistry* **40**, 603–608 (2001).
37. Papadimou, E., Monastirli, a, Tsambaos, D. & Drinas, D. Additive inhibitory effect of calcipotriol and anthralin on ribonuclease P activity. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 91–4 (2000).
38. Kawamoto, S. a *et al.* Studies on the mechanism of inhibition of bacterial ribonuclease P by aminoglycoside derivatives. *Nucleic Acids Res.* **36**, 697–704 (2008).
39. Eubank, T. D. *et al.* Inhibition of bacterial RNase P by aminoglycoside-arginine conjugates. *FEBS Lett.* **511**, 107–12 (2002).
40. Mikkelsen, N. E., Brännvall, M., Virtanen, a & Kirsebom, L. a. Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6155–60 (1999).
41. Liu, X., Chen, Y. & Fierke, C. a. A real-time fluorescence polarization activity assay to screen for inhibitors of bacterial ribonuclease P. *Nucleic Acids Res.* 1–12 (2014). doi:10.1093/nar/gku850
42. Grünweller, A. & Hartmann, R. Chemische Nukleinsäure-Modifikationen für RNA-basierte Therapeutika. *Pharmakon* **3**, 263–270 (2015).

43. Burnett, J. C. & Rossi, J. J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* **19**, 60–71 (2012).
44. Kurreck, J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1628–1644 (2003).
45. Bennett, C. F. & Swayze, E. E. RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 259–293 (2010).
46. Warnecke, J. M., Sontheimer, E. J., Piccirilli, J. a & Hartmann, R. K. Active site constraints in the hydrolysis reaction catalyzed by bacterial RNase P: analysis of precursor tRNAs with a single 3'-S-phosphorothiolate internucleotide linkage. *Nucleic Acids Res.* **28**, 720–7 (2000).
47. Persson, T., Cuzic, S. & Hartmann, R. K. Catalysis by RNase P RNA: unique features and unprecedented active site plasticity. *J. Biol. Chem.* **278**, 43394–401 (2003).
48. Cuzic, S., Heidemann, K. A., Wöhnert, J. & Hartmann, R. K. Escherichia coli RNase P RNA: substrate ribose modifications at G+1, but not nucleotide -1/+73 base pairing, affect the transition state for cleavage chemistry. *J. Mol. Biol.* **379**, 1–8 (2008).
49. Cuzic, S. & Hartmann, R. K. Studies on Escherichia coli RNase P RNA with Zn<sup>2+</sup> as the catalytic cofactor. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2464–74 (2005).
50. Pavlova, L. V *et al.* tRNA processing by protein-only versus RNA-based RNase P: kinetic analysis reveals mechanistic differences. *Chembiochem* **13**, 2270–6 (2012).
51. Gößringer, M. & Hartmann, R. K. Function of heterologous and truncated RNase P proteins in Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* **66**, 801–13 (2007).
52. Wegscheid, B. & Hartmann, R. K. The precursor tRNA 3'-CCA interaction with Escherichia coli RNase P RNA is essential for catalysis by RNase P in vivo. *RNA* **12**, 2135–48 (2006).
53. Busch, S., Kirsebom, L. A., Notbohm, H. & Hartmann, R. K. Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by Escherichia coli RNase P RNA. *J. Mol. Biol.* **299**, 941–51 (2000).
54. Niranjanakumari, S., Kurz, J. C. & Fierke, C. a. Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from Bacillus subtilis. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3090–6 (1998).
55. Wegscheid, B. & Hartmann, R. K. In vivo and in vitro investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2060–73 (2007).
56. Studier, F. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219**, 37–44 (1991).
57. Sekiguchi, M. & Iida, S. Mutants of Escherichia coli permeable to actinomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **58**, 2315–2320 (1967).

- 
58. Matulis, D., Kranz, J., Salemme, F. & Todd, M. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry* **44**, 5258–5266 (2005).
  59. Carver, T. E. *et al.* Decrypting the biochemical function of an essential gene from *Streptococcus pneumoniae* using ThermoFluor technology. *J. Biol. Chem.* **280**, 11704–12 (2005).
  60. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
  61. Wright, G. D. Antibiotics: a new hope. *Chem. Biol.* **19**, 3–10 (2012).
  62. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 119–46 (2009).
  63. Gobbi, A. & Frenking, G. Y-conjugated compounds: the equilibrium geometries and electronic structures of guanidine, guanidinium cation, urea, and 1, 1-diaminoethylene. *J. Am. Chem. Soc.* **4**, 2362–2372 (1993).
  64. Mikkelsen, N. & Johansson, K. Aminoglycoside binding displaces a divalent metal ion in a tRNA–neomycin B complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 510–514 (2001).
  65. Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 177–82 (2005).
  66. Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J. & Pompliano, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 29–40 (2007).
  67. Zhang, J., Chung, T. & Oldenburg, K. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73 (1999).
  68. Ling, L. L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**, 455–459 (2015).
  69. Pradeepa *et al.* Preparation of gold nanoparticles by novel bacterial exopolysaccharide for antibiotic delivery. *Life Sci.* **153**, 171–179 (2016).
  70. Mielcarek, A., Blauenburg, B., Miethke, M. & Marahiel, M. A. Molecular Insights into Frataxin-Mediated Iron Supply for Heme Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).



**Anhang****Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar (mol/L)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fwd	forward
g	Gramm
h	Stunde
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	lysogeny broth
M	Molar (mol/L)
m	Meter
mA	Milliamper
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid

NTP	Ribonukleinsäuretriphosphate
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Pikomol
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Übernacht-Kultur
V	Volt
XCB	Xylencyanolblau





**Publikationen bzw. Manuskripte**

Walczyk D., Willkomm D.K., Hartmann R.K., Bacterial type B RNase P - functional characterization of the L5.1-L15.1 tertiary contact and antisense inhibition, *RNA* (2016), accepted.

Walczyk D., Gößringer M., Rossmann W., Zatsarinin T.S., Oretskaya T.S., Hartmann R.K., Analysis of the cleavage mechanism by protein-only RNase P using precursor tRNA substrates with modifications at the cleavage site, (2016), in revision (Stand: 15.08.2016).

Walczyk, D. & Hartmann, R. K. Von der RNA-zur Protein-Welt. *q&more* **2**, 6–11 (2013).

**Konferenzbeiträge**

Walczyk D., Seidler S., Gößringer M., Hartmann R.K., Proteinaceous vs. bacterial RNase P: a comparative mechanistic analysis; RNA Biochemistry-Meeting (2014), Bonn.

Walczyk D., Scheer F., Ehlert F., Thomas M., Glinca S., Diederich W., Hartmann R.K., Analysis of inhibitors of a bacterial RNase P; RNA Biochemistry-Meeting (2012), Bonn.

## ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Inhibition der bakteriellen RNA-basierten Ribonuklease P und Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Protein-basierten Ribonuklease P aus *Arabidopsis thaliana*“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen sind Zitate als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 15.08.2016

.....

(Dennis Walczyk)